



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

**Sledování a detekce kmenů *Escherichia coli*  
a *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL  
v Nemocnici Prachatice, a. s. v období 2014–2018.**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/

ZDRAVOTNÍ LABORANT

**Autor:** Pavla Tvrdková

**Vedoucí práce:** Ing. Tomáš Nix, PhD.

České Budějovice 2019

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Sledování a detekce kmenů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v Nemocnici Prachatice, a. s. v období 2014–2018 jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 29. 4. 2019

.....

*Pavla Tvrdková*

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu Ing. Tomášovi Nixovi, PhD. za jeho cenné rady, trpělivost a také čas, který mi věnoval při vedení této bakalářské práce. Dále bych poděkovala celému týmu Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Prachatice, a.s., kde probíhala metodická část této práce. V neposlední řadě mnohokrát děkuji své rodině a příteli za podporu po celou dobu mého studia.

# Sledování a detekce kmenů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v Nemocnici Prachatice, a. s. v období 2014–2018.

## Abstrakt

Bakteriální rezistence a její stále se zvyšující nárůst je velmi závažným problémem rozšířeným po celém světě. Některé bakterie jsou rezistentní přirozeně, některé však rezistenci získávají. Proto se můžeme setkat s bakterií, která byla původně antibiotiky bez problémů zničena, ale v průběhu času, díky komunikaci mezi různými bakteriálními druhy a předávání si informací v podobě různých mutací a také často i nesprávnému podání antibiotik a působení selekčního tlaku, se stane bakterií rezistentní na určitá antibiotika. Jedním typem takto získané rezistence je produkce širokospektrých beta-laktamáz typu ESBL.

Cílem této práce je zjistit zastoupení a vývoj produkce ESBL u kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae*, jakožto nejčastějších producentů těchto širokospektrých beta-laktamáz, na jednotlivých nemocničních odděleních a v různých typech klinického materiálu v časovém úseku 5 let. Práce je také zaměřena na vývoj antibiotické rezistence rovněž v časovém úseku 5 let.

Sběr dat a metodické provedení probíhalo na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Prachatice, a.s. Pro určení mikroba byla použita komerční souprava ENTEROtest 24 N a INDOL test. Pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám byla použita disková difuzní metoda a metoda stanovení minimální inhibiční koncentrace. Pro detekci ESBL byl použit komerční set MASTDISC AmpC a ESBL (D68C).

Bylo zjištěno že, téměř každým rokem (kromě 2016) se počet kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL zvyšoval. Bylo také zjištěno, že největší počet producentů ESBL byl zachycen u kmenů *Klebsiella pneumoniae*. Dále byly producenti ESBL rozděleni podle nemocničních oddělení, kde byl zjištěn u obou producentů nejčastější výskyt ESBL na interním oddělení. Dále bylo provedeno rozdělení producentů ESBL podle záchytu v různých typech klinického materiálu, kde u obou mikrobů byl největší záchyt v moči. Díky této skutečnosti byl zjištěn vývoj antibiotické rezistence u obou mikrobů v časovém úseku 5 let právě ve vzorcích moči.

Při sledování vývoje antibiotické rezistence v časovém úseku 5 let nebyl zjištěn u jednotlivých antimikrobiálních látek výrazný nárůst rezistentních kmenů. Pouze u cefalosporinů 3. generace byl zaznamenán jistý nárůst rezistence téměř každým rokem

u obou mikrobů. Konkrétně u izolátů *Escherichia coli* se procentuální počet rezistentních kmenů na tato antibiotika zvýšil z 6 % na 9 % a u izolátů *Klebsiella pneumoniae* se zvýšil z 29 % na 33 %.

**Klíčová slova**

Bakteriální rezistence; beta-laktamová antibiotika; širokospektré beta-laktamázy ESBL; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*

# **Monitoring and detection of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains with Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) production in Hospital Prachatice, a. s. in 2014-2018.**

## **Abstract**

The ever increasing resistance of bacteria is a grave issue world-wide. Some bacteria are resistant naturally but for other resistance is acquired. As a result, we can encounter bacterium that would formerly be quite easily killed by administering antibiotics but, in the course of time, as a result of, for example, communication between various bacteria species and strains in the form of various mutations and, frequently, after the administration of incorrect antibiotic and the effects of selective antibiotic pressure, the same bacterium becomes resistant to antibiotics. One of the types of such acquired resistance is the production of broad-spectrum beta-lactamases ESBL.

The objective of this thesis is to establish the representation and development of ESBL production in *Escherichia coli* strains and *Klebsiella pneumoniae* strains as these make the most frequent producers of these broad-spectrum beta-lactamases, in certain hospital departments and in various types of clinical materials over the period of 5 years. In addition, the thesis focuses on the development of antibiotic resistance, accordingly, over the 5 year period.

Data gathering and utilization of methods took place at the Medical Microbiology Department of the Prachatice Hospital (*Nemocnice Prachatice, a.s.*). To identify microbes to a more precise level, the commercial set ENTEROtest 24 N and INDOL test were used. The disk diffusion method and method for determining the minimum inhibitory concentration were used to determine sensitivity to antimicrobial agents. The commercial set MASTDISC AmpC and ESBL (D68C) were used to detect ESBL.

The outcomes indicated that the number of *Escherichia coli* strains producing ESBL and *Klebsiella pneumoniae* strains producing ESBL grew almost each year (with the exception of 2016). The outcomes also indicated that the greatest number of ESBL producers were found with *Klebsiella pneumoniae* strains. Furthermore, the ESBL producers were grouped depending on hospital departments in which most frequent occurrences were found; the most frequent ESBL occurrence of both producers was found in the department of internal medicine. Additionally, the ESBL producers were grouped based on capture in various types of clinical materials; the greatest quantities of both microbes were found in urine. Based on these findings, the development of antibiotic

resistance for both microbes over the period of 5 years was analyzed on samples of urine.

When monitoring antibiotic resistance development, no considerable growths in bacterial strains resistant to individual anti-microbial agents was found over the 5 year period. Only for 3rd generation cephalosporins, there was a certain growth in resistance detected almost every year for both microbes. Namely, *Escherichia coli* isolates showed a growth from 6 % to 9 % and *Klebsiella pneumoniae* isolates showed a growth from 29 % to 33 % in the percentual quantity of strains resistant to these antibiotics.

**Key words**

Bacterial resistance; beta-lactam antibiotics; extended spectrum beta-lactamases ESBL; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*

## Obsah

Obsah .....	8
1. Úvod .....	10
2. Teoretická část .....	11
2.1 Rod <i>Escherichia</i> .....	11
2.1.1 Vztah s makroorganismem .....	11
2.1.2 Patogenita .....	11
2.1.3 Klinický význam .....	11
2.2 Rod <i>Klebsiella</i> .....	12
2.2.1 Vztah s makroorganismem .....	12
2.2.2 Patogenita .....	12
2.2.3 Klinický význam .....	12
2.3 Rezistence k antibiotikům .....	13
2.3.1 Přirozená rezistence .....	13
2.3.2 Získaná rezistence .....	14
2.4 Mechanismy rezistence .....	14
2.4.1 Enzymatická inaktivace antibiotika .....	14
2.4.2 Snížený příjem antibiotika nebo jeho aktivní transport z buňky .....	14
2.4.3 Modifikace cílového místa .....	15
2.4.4 Náhrada zablokované metabolické dráhy .....	16
2.5 Genetická podstata rezistence .....	16
2.5.1 Mutace .....	16
2.5.2 Horizontální přenos genů .....	17
2.5.3 Multirezistence .....	17
2.6 Beta-laktamová antibiotika .....	17
2.6.1 Peniciliny .....	18
2.6.2 Cefalosporiny .....	18
2.6.2.1 I. generace .....	19
2.6.2.2 II. generace .....	19
2.6.2.3 III. generace .....	19
2.6.2.4 IV. generace .....	20
2.6.2.5 V. generace .....	20
2.6.3 Monobaktamy .....	20
2.6.4 Karbapenemy .....	21
2.6.5 Inhibitory beta-laktamáz .....	21
2.7 Beta-laktamázy .....	21
2.7.1 Klasifikace .....	22
2.7.1.1 Dle Bushové-Jacoby-Medeirose .....	22
2.7.1.2 Dle Amblera .....	22
2.7.2 Širokospektré beta-laktamázy typu ESBL .....	23
3. Cíle práce a hypotézy .....	24
3.1 Cíle práce .....	24
3.2 Hypotézy .....	24
4. Metodika .....	25
4.1 Postup při zpracování klinického materiálu .....	25
4.1.1 Moč .....	26
4.1.2 Sputum .....	26
4.1.3 Rána .....	27
4.1.4 Hemokultura .....	27
4.1.5 Punktát .....	29



4.1.6	Pochva.....	29
4.1.7	Kanyla.....	30
4.2	<i>Biochemická identifikace</i> .....	30
4.2.1	ENTEROtest 24 N .....	30
4.2.1.1	Indol test.....	31
4.2.1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	32
4.2.1.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	32
4.3	<i>Zjišťování citlivosti k antimikrobiálním látkám</i> .....	32
4.3.1	Diskový difúzní test.....	33
4.3.2	Diluční mikrometoda (MIC).....	34
4.4	<i>Vyhledávání kmenů produkujících ESBL</i> .....	35
4.4.1	MASTDISC AmpC a ESBL detekční set (D68C).....	36
5.	Výsledky.....	38
5.1	<i>Rozdělení výskytu izolátů podle jednotlivých oddělení v nemocnici</i> .....	39
5.1.1	<i>Escherichia coli</i> s produkcí ESBL.....	39
5.1.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> s produkcí ESBL .....	41
5.2	<i>Rozdělení výskytu izolátů v klinickém materiálu</i> .....	42
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> s produkcí ESBL.....	42
5.2.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> s produkcí ESBL .....	43
5.3	<i>Vývoj antibiotické rezistence</i> .....	45
5.3.1	<i>Escherichia coli</i> .....	45
5.3.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	47
6.	Diskuse .....	49
7.	Závěr.....	52
8.	Seznam literatury.....	55
9.	Seznam příloh.....	61
10.	Seznam zkratk.....	68

## 1. Úvod

Antibiotika jsou dnes v klinické praxi rutinně využívána především pro léčbu bakteriálních infekcí. V průběhu let, ale zejména v současné době, díky jejich masivnímu používání došlo k tomu, že bakterie si vyvinuli své vlastní ochranné mechanismy, které jim umožňují přežít útok konkrétního antibiotika a stávají se pak vůči němu rezistentní. Pokud je bakterie rezistentní k určité skupině antibiotik, velice často také získává rezistenci i k dalším skupinám antibiotik, což představuje velkou hrozbu v léčbě infekcí, způsobených právě těmito multirezistentními kmeny.

Jednou z možných typů rezistence představují tzv. širokospektré beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinku, označované jako ESBL. Jejich nejčtenější výskyt je zaznamenán u čeledi *Enterobacteriaceae*, hlavně u gramnegativních tyček kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae*, které patří i s dalšími zástupci této čeledi také mezi obávané multirezistentní kmeny bakterií.

Bakterie produkující ESBL představují celosvětově stále se zvyšující problém, a to zejména díky jejich schopnosti hydrolyzovat beta-laktamová antibiotika, která se pak stávají nefunkčními. Důsledkem toho dochází k selhání antimikrobiální terapie. Nastávají komplikace v léčbě a s tím také spojené i zvýšené náklady na léčbu a častější úmrtí. Další dopad spojený s inaktivací této skupiny antibiotik je zpožděné podání skutečně účinného antibiotika. Základní problém, související s čím dál častějším výskytem ESBL, je rovněž nadužívání širokospektrých antibiotik, především cefalosporinů 3. generace.

Nedílnou součástí je i šíření ESBL pozitivních bakterií, především v nemocničních zařízeních, kde mohou způsobit u hospitalizovaných pacientů vážné a obtížně léčené infekce, jelikož se většinou jedná o kmeny multirezistentní. V tomto směru by měl být kladen velký důraz na hygienu, volbu dezinfekčních prostředků, likvidaci potenciálně infekčního materiálu,... Správným dodržováním hygienických předpisů a opatření na příslušných odděleních je možno přispět k zamezení šíření tohoto typu rezistence.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Rod *Escherichia*

Patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a je tvořen gramnegativními rovnými tyčkami, které se mohou vyskytovat jednotlivě a ve dvojicích. Většina kmenů je pohyblivých díky přítomnosti bičíků. Kultivují se na běžných půdách při teplotě 37 °C. Biochemická aktivita se vyznačuje štěpením glukózy a laktózu s produkcí plynu, tvoří indol a neštěpí močovinu (Sedláček, 2007).

Nejnámějším mikroblem patřící do tohoto rodu je *Escherichia coli* (Příloha č. 4). Svůj název získala po svém objeviteli, rakouském lékaři a bakteriologovi, jménem Theodor von Escherichia v roce 1885 (Votava, 2003).

#### 2.1.1 Vztah s makroorganismem

U zdravých lidí tvoří běžnou součást střevní mikroflóry. Ve vztahu s makroorganismem je *Escherichia coli* komenzál, částečně saprofyt a také symbiont. Symbiotický vztah spočívá v možnosti bakterie produkovat tzv. koliciny, které jsou pro některé jiné bakterie toxické. *Escherichia coli* je tudíž tímto způsobem schopna znemožnit průnik patogenů. Může se jednat i o přímou prospěšnost, jako je tvorba vitamínu K (Votava, 2003).

#### 2.1.2 Patogenita

*Escherichia coli* se řadí mezi podmíněně (oportunně) patogenní. Mimo střevo je patogenní skoro vždy, ovšem ve střevě je patogenní pouze, pokud kmen obsahuje specifické faktory virulence. Mezi střevní patogenní kmeny jsou zařazeny EPEC (enteropatogenní), ETEC (enterotoxigenní), EIEC (enteroinvazivní), STEC (shigatoxigenní), DAEC (difuzně adherentní) a EAaggEC (enteroagregativní). Mimo střevo se vyskytují patogenní kmeny UPEC (uropatogenní). Obecně lze říci, že *Escherichia coli* tvoří až 80% možných močových infekcí (Votava, 2003).

#### 2.1.3 Klinický význam

Kmeny *Escherichia coli*, produkující enterotoxiny a jiné faktory virulence, jsou častými původci průjmových onemocnění. Dále tento druh je také významným původcem močových infekcí a nozokomiálních infekcí. Oportunně patogenní kmeny se vyskytují nejčastěji ve spojitosti s infekcemi různých rán (Sedláček, 2007).

## 2.2 Rod *Klebsiella*

Patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a je tvořen gramnegativními rovnými tyčkami, které se mohou vyskytnout buď jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Charakteristickým znakem může být pouzdro, které způsobuje mukózní vzhled narostlých kolonií a také nepohyblivost bakterie. Kultivace probíhá na běžných půdách při teplotě 37 °C. Biochemické vlastnosti jsou u toho druhu fermentace glukózy za tvorby plynu a cukerných alkoholů, netvoří indol (kromě *Klebsiella oxytoca*) a většina druhů štěpí močovinu (Sedláček, 2007).

*Klebsiella* získala svůj název po německém lékaři Edwinu Klebsovi v roce 1883. Objevena a izolována byla v téže roce, ovšem berlínským patologem Carlem Friedländerem. Mezi nejběžnější druhy se řadí *Klebsiella pneumoniae* (Příloha č. 5) a *Klebsiella oxytoca* (Votava, 2003).

### 2.2.1 Vztah s makroorganismem

Působí jako střevní komenzály a tvoří běžnou součást střevní mikroflóry. Stejně jako *Escherichia coli* se řadí mezi oportunně patogenní. Vyskytuje se také běžně v dýchacích cestách (Sedláček, 2007).

### 2.2.2 Patogenita

Pro tento rod jsou významné manóza senzitivní fimbrie, které plní svou funkci při adhezi bakterie k povrchům. Dále pak přítomnost polysacharidového pouzdra přináší bakteriím určitou výhodu, ale i nevýhodu. Kmeny bez pouzdra se vyznačují tím, že jejich schopnost adheze na epitelie střeva nebo močového měchýře je vyšší než u opouzdřených kmenů. Ovšem naproti tomu kmeny opouzdřené zřejmě potlačují imunitní odpověď jako například tím, že dochází k produkci IL-6 a TNF (Votava, 2003).

### 2.2.3 Klinický význam

*Klebsiella* je druhým nejčastějším původcem infekcí močových cest. Je také známa tím, že se velice často uplatňuje u nozokomiálních infekcí, které jsou většinou příčinou sepse a jsou velmi obtížně léčitelné, protože právě nemocniční kmeny jsou často nositeli širokospektrých beta-laktamáz. Může také způsobit infekce dýchacích cest, kdy se obvykle jedná o pneumonie s rychlým nástupem infekce. Ta se vyznačuje charakteristickým červenohnědým sputem. V jiných případech může způsobit až plicní abscesy (Votava, 2003).

## 2.3 *Rezistence k antibiotikům*

V současné době patří rezistence k antibiotikům k velmi závažným problémům a je pravděpodobné, že v nedaleké budoucnosti nastanou situace, kdy i běžná infekce se stane obtížně nebo zcela neléčitelná (Nyč, 2017).

Antibiotická rezistence je přirozený jev, ke kterému dochází, jakmile jsou mikroorganismy vystaveny působení antibiotik. Vlivem selekčního tlaku antibiotik jsou citlivé bakterie inhibovány, zatímco bakterie rezistentní mají větší šanci přežít a množit se (Prestinaci et al., 2015).

Pokud přestane působit selekční tlak, rezistentní kmeny mohou být postupně zničeny, díky přítomnosti a konkurenci původních tzv. wild bakterií, které tvoří běžnou mikroflóru. Jak rychle bude docházet k eliminaci počtu rezistentních kmenů, závisí ovšem na tom, o kolik budou mít tyto kmeny v důsledku rezistence sníženou celkovou zdatnost zvanou fitness (Beneš, 2018).

Významným nebezpečím způsobeným rezistencí je vznik patogenních bakterií, které byly původně zcela medicínsky nevýznamné. Největší problém představují s tím spojené nozokomiální infekce u oslabených pacientů, kteří při pobytu a léčbě v nemocnici mohou získat tyto rezistentní bakterie. Většinou jsou velmi obtížně léčitelné kvůli multirezistenci bakterií a přímo ohrožují život pacienta. Celosvětově se vyskytly opodstatněné obavy ze ztráty účinnosti antimikrobiálních látek a výrazně se také zvýšily náklady právě na léčbu infekcí, způsobené rezistentními kmeny (Rozsypal, 2015).

Ke zvýšení odolnosti bakterií k antibiotikům přispívá jednak jejich nadměrné užívání, nevhodné použití či nedostatečné dávkování. Z toho vyplývá, že by se tyto léky měly indikovat zcela cíleně a nejlépe na podkladu mikrobiologického vyšetření, díky kterému získá klinik určeného původce infekce (Prestinaci et al., 2015).

V současné klinické praxi však stále místo cílené léčby převládá zcela opačný přístup, zvaný empirický. Ten spočívá v aplikaci antibiotik bez laboratorního podkladu, tedy bez konkrétního mikrobiologického vyšetření. Výběr konkrétního léku se pak řídí jen podle charakteristických klinických příznaků. Ne vždy se však jedná o jasnou etiologii. V těchto případech se podávají širokospektrá antibiotika, která mají mimo jiné velmi významný vliv na vzniku a šíření rezistence (Bauer et al., 2011).

### 2.3.1 **Přirozená rezistence**

Přirozená rezistence, jinak zvaná také vrozená či primární, je určena strukturou bakteriální buňky. Buňka s přirozenou rezistencí nemá transportní systém, který

by umožnil dopravit antibiotikum do konkrétní buňky. Další příčinou nefunkčnosti antibiotika může být nepřítomnost cílové struktury bakteriální buňky, na kterou působí. Buněčná stěna některých bakterií může být také pro antibiotika nepropustná, což je další z možností přirozené rezistence (Schindler, 2014).

Přirozenou rezistenci vůči penicilinu, makrolidům a linkosamidům mají gramnegativní střevní tyčky. Například *Klebsiella pneumoniae* je primárně rezistentní k ampicilinu (Votava, 2001).

### **2.3.2 Získaná rezistence**

Získaná rezistence, jinak zvaná také sekundární, představuje velkou hrozbu, protože stále více přibývá lékařsky významných rezistentních bakterií. Tato rezistence spočívá v tom, že kmen, který byl původně citlivý, se stane k antibiotiku necitlivý (Votava, 2005).

## **2.4 Mechanismy rezistence**

Bakterie využívají různé mechanismy, které jim umožňují stát se rezistentními k antibiotikům. Vybrala jsem 4 zásadní mechanismy.

### **2.4.1 Enzymatická inaktivace antibiotika**

Mnoho bakterií produkuje enzymy, které nevratně modifikují a inaktivují antibiotika. Mezi všemi enzymy mající tuto schopnost, patří také beta-laktamázy. Tyto enzymy hydrolyzují beta-laktamový kruh, který je součástí všech beta-laktamových antibiotik, a tím se tato antibiotika stávají neúčinná (Jacoby a Munoz-Price, 2005).

Další možností může být připojení různých postranních skupin např. acetylace či fosforylace aminoglykosidů (Beneš, 2018).

Tento mechanismus se vyskytuje velice často, jelikož se jedná o velmi účinný způsob dosažení rezistence. Účinnost spočívá v jediné molekule enzymu, která dokáže rychle inaktivovat velké množství molekul antibiotika. Další výhodou je snadné šíření rezistence mezi bakteriemi (Beneš, 2018).

### **2.4.2 Snížený příjem antibiotika nebo jeho aktivní transport z buňky**

Pomocí těchto mechanismů dochází ke změně propustnosti bakteriální membrány nebo membránové pumpy. Oba tyto způsoby vedou ke snížení množství antibiotika v bakteriální buňce (Beneš, 2018).

Důležitou bariéru představuje membrána gramnegativních bakterií. Její vnitřní vrstva je tvořena fosfolipidy a vnější vrstva obsahuje lipopolysacharid. Obecně tato

membrána chrání bakterie před pronikáním různých látek. Hlavní roli zde hrají transmembránové proteiny zvané poriny, což jsou jakési kanálky, přes které mohou procházet hydrofilní molekuly antibiotik. Změna propustnosti membrány souvisí tedy jednak poriny a jednak se strukturními změnami lipopolysacharidu. Množství antibiotika, které se do buňky může dostat, výrazně ovlivňuje snížení počtu, změna velikosti či propustnosti porinů (Kumar a Schweizer, 2005).

V roce 2005 byla např. zjištěna rezistence k cefoxitinu a ceftazidimu u kmenů *Klebsiella pneumoniae* a kmenů *Escherichia coli* právě díky ztrátě porinu, konkrétně porinu Omp K35 (Ananthan a Subha, 2005).

V aktivním transportu antibiotika z bakteriální buňky je důležitá přítomnost tzv. efluxních systémů. Těchto systémů využívají bakterie k odčerpávání nežádoucích látek (antibiotika) z buňky proti koncentračnímu gradientu, což je pro buňku velmi energeticky náročné. Efluxní pumpy zajišťují likvidaci molekul antibiotika, které se dostaly do buňky. Jejich kapacita je však omezená, tzn. že mohou z bakteriální buňky odčerpat pouze určité množství antibiotika za daný čas. Z toho vyplývá hlavní úloha celého mechanismu, která je snižování koncentrace antibiotika v bakteriální buňce. Výhoda efluxních pump je taková, že jsou schopné odčerpat z buňky i několik druhů nežádoucích molekul. Tímto způsobem se stávají bakteriální buňky odolné proti několika různým druhům antibiotik (Beneš, 2018).

### **2.4.3 Modifikace cílového místa**

U tohoto mechanismu je důležitá schopnost bakterií změnit struktury, na které se antibiotika vážou. Můžou to být enzymy, ribozomy nebo stavební látky buněčné stěny. Pokud vznikne takto modifikované cílové místo, antibiotikum k němu ztratí afinitu a bakteriální buňku nezabije (Beneš, 2018).

Změna cílového místa může být způsobena např. mutacemi v genech, které kódují ribosomální RNA. Tím způsobují rezistenci např. tetracyklinů a makrolidů. Dalším příkladem je rezistence k beta-laktamům, která je způsobena mutací genů, jejichž produkty se podílejí na syntéze peptidoglykanu. Také byla popsána rezistence k chinolonům, která může být způsobena mutací v cílových místech DNA gyrázy. Může být ale také vyvolána syntézou peptidu Qnr, který chrání DNA gyrázu před navázáním antibiotika (Urbášková et al., 2012).

#### 2.4.4 Náhrada zablokované metabolické dráhy

Tento mechanismus spočívá v zablokování nějaké metabolické dráhy a využití jiné dráhy zvané alternativní. Může nastat případ, kdy antibiotikum zablokuje bakteriím některou z důležitých metabolických drah. Bakterie jsou však schopné bránit se tím, že využívají alternativní dráhy. Ty jsou sice někdy méně výkonné, ale bakteriím zcela stačí pro život. Např. u enterokoků je popsána kompenzace účinku sulfonamidů. Sulfonamidy blokují enterokokům syntézu kyseliny tetrahydrolistové. Ovšem tyto bakterie jsou schopné začít využívat kyselinu listovou, které je v lidském těle dostatek, což představuje alternativní dráhu (Beneš, 2018).

#### 2.5 Genetická podstata rezistence

Bakterie mají pozoruhodnou genetickou variabilitu, která jim umožňuje reagovat na širokou škálu environmentálních vlivů, jako jsou právě i molekuly antibiotik, které jejich existenci mohou ohrozit. Bakterie využívají dvě hlavní genetické strategie, aby odolaly antibiotickému útoku. První z nich jsou mutace v genech a druhou strategií je horizontální přenos genů (Munita a Cesar, 2016).

U čeledi *Enterobacteriaceae*, kam patří i *Klebsiella pneumoniae* a *Escherichia coli*, je vysoká rezistence k antibiotikům způsobena mutacemi chromozomálních genů, schopností sdílet genetický materiál a přítomností mobilních genetických elementů. Nejvýznamnější pro šíření rezistence jsou právě tyto mobilní genetické elementy, které jsou zodpovědné za zachycování rezistentních genů z chromozomů různých bakteriálních druhů a jejich přesunu mezi molekulami DNA (Partridge, 2015).

##### 2.5.1 Mutace

Obecný význam mutace je možné chápat tak, že se z běžně citlivé bakterie stane právě díky nějaké mutační změně tzv. rezistentní mutant. Bakterie, u kterých se vytvoří mutace v genech, získávají jakousi výhodu pro přežití. Tato výhoda spočívá v jejich přežití v přítomnosti antimikrobiální látky. Dá se říci, že mutace vedoucí k bakteriální rezistenci mění účinek působícího antibiotika (Munita a Cesar, 2016).

K mutacím může docházet zcela spontánně, a to při dělení buněk. Počet mutantů, tedy vzniklých rezistentních bakterií, je přibližně  $10^{-8}$ . Předpokládejme, že v 1 ml kultury *Escherichia coli*, je  $10^9$  citlivých buněk. Z toho vyplývá, že 10 buněk bude rezistentních (Schindler, 2014).



### 2.5.2 Horizontální přenos genů

K horizontálnímu přenosu genů dochází přes mobilní genetické elementy, mezi které patří plazmidy, transpozony a integrony. Tyto elementy jsou schopné přenášet genetickou informaci z jedné bakterie do druhé. Dokáží ale také přenášet geny i v rámci jedné buňky např. mezi chromozomem a plazmidem (Bennett, 2008).

K tomuto typu přenosu rezistence může dojít třemi způsoby. Prvním z nich je konjugace. Tento mechanismus je zprostředkován pomocí charakteristického výběžku cytoplazmy, zvaného sex pilus nebo F pilus. Jedná se o přímý přenos genetické informace. Druhou možností je transdukce. Zde má hlavní úlohu bakteriofág (virus napadající bakterie), díky němuž dojde k přenosu genetické informace do bakteriální buňky. Jak velký fragment DNA bude přenesen, záleží na velikosti viru. Posledním třetím mechanismem je transformace. Jedná se o schopnost bakterií, získat DNA přímo z okolí, nejčastěji z mrtvých bakterií. Cílem je snaha bakterie získat z okolního prostředí nukleotidy, jinými slovy získat hotové substráty pro syntézu své DNA (Beneš, 2018).

### 2.5.3 Multirezistence

Pod pojmem multirezistence (z *anglického MDR, multidrug resistance*) si můžeme představit bakterii, která je necitlivá alespoň k jednomu antibiotiku ze tří různých skupin antibiotik. Typickým příkladem je kmen *Pseudomonas aeruginosa*, který splňuje požadavky na multirezistenci tím, že je necitlivý k imipenemu (skupina karbapenemů), ceftazidimu (cefalosporin) a k ciprofloxacinu (fluorochinolon) (Beneš, 2018).

Multirezistentní kmeny bakterií jsou považovány za jednu z největších současných hrozeb pro lidstvo. Velmi často jsou původci nozokomiálních nákaz. Z toho vyplývá, že infekce způsobené těmito rezistentními kmeny, jsou spojeny se zvýšenou morbiditou (nemocností), mortalitou (úmrtností) a také se zvyšujícími náklady na zdravotní péči a užívání antibiotik. Největší hrozbu představují bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, a to kvůli jejich, čím dál častější, produkci beta-laktamáz s rozšířeným spektrem účinku (Van Duin a Paterson, 2016).

## 2.6 *Beta-laktamová antibiotika*

Tato skupina antibiotik představuje nejčastěji používaná léčiva v praxi. Jejich velká výhoda spočívá v účinnosti a vlastnostech, jako např. baktericidní účinek a minimální toxicita. Jsou velmi často aplikována jak u komunitních, tak i nozokomiálních infekcí. Jejich spektrum účinku je široké, protože zahrnuje grampozitivní i gramnegativní

bakterie. Základní strukturní složkou je čtyřčlenný beta-laktamový kruh, který je zodpovědný za antibakteriální účinek všech těchto antibiotik. Podle rozdílnosti molekulárních struktur se rozlišují 4 skupiny: peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy. V poslední době, kvůli velmi časté aplikaci těchto antibiotik, došlo k významnému rozšíření bakteriálních mechanismů, způsobujících rezistenci k beta-laktamům. Z těchto mechanismů jsou nejdůležitější širokospektré beta-laktamázy typu ESBL, způsobující rezistenci k zmíněným antibiotikům (Htoutou Sedláková, 2012).

### 2.6.1 Peniciliny

Peniciliny jsou získávány nejčastěji z plísně *Penicillium chrysogenum*. Mohou být však také získány i z jiných plísní. Všechny ovšem musí být schopné produkovat kyselinu 6-aminopenicilanovou. Ta je zde důležitá, protože v její molekule je obsažen beta-laktamový kruh, který je konjugován s thiazolidinovým pětičlenným kruhem. Tato antibiotika se vyznačují velmi nízkou toxicitou, vysokou účinností a dobrou pronikavostí do tělních tekutin a tkání. Rozdělují se do několika skupin, které se liší svou šíří antibakteriálního spektra a jak moc jsou stabilní vůči nízkému pH a beta-laktamázám. Mezi nejznámější penicilinová antibiotika se řadí penicilin G (benzylpenicilin), penicilin V, oxacilin, ampicilin, amoxicilin a piperacilin (Votava, 2001).

Ampicilin, amoxicilin, piperacilin a tikarcilin mohou být užívány také jako kombinované léky s inhibitory beta-laktamázy (budou popsány níže). Aplikují se při závažných infekcích, které jsou způsobené enterobakteriemi nebo penicilin-rezistentními stafylokoky (Drawz a Bonomo, 2010).

### 2.6.2 Cefalosporiny

Plíseň *Cephalosporium acremonium* produkuje cefalosporin C, který sám o sobě není pro terapeutické účely dostatečně silný. Může však být přeměněn na kyselinu 7-aminocefalosporanovou, která již tvoří základ všech cefalosporinů. Spektrum účinku těchto antibiotik je velmi široké, protože se využívají jak pro léčbu infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi, tak i pro infekce způsobené gramnegativními bakteriemi (Hardianto et al., 2016).

Právě díky spektru účinku jsou cefalosporiny rozděleny do pěti generací. Platí že, čím vyšší je číslo generace, tím se zhoršuje účinnost příslušných antibiotik proti grampozitivním bakteriím, ale účinnost proti gramnegativním mikrobům se zvyšuje (Lincová a Farghali, 2007).

Je známo, že cefalosporiny vyšších generací jsou velice finančně náročná antibiotika (Votava, 2001).

### **2.6.2.1 I. generace**

Antibiotika patřící do této generace mají spektrum účinku pokrývající grampozitivní koky, včetně viridujících streptokoků, hemolytických streptokoků skupiny A a *Staphylococcus aureus*. Velmi dobře také působí na gramnegativní bakterie rodu *Escherichia*, *Klebsiella* a *Proteus*. Nepůsobí na enterokoky a meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*, stejně jako všechny ostatní cefalosporiny (Papadakis et al., 2018).

Pro perorální podání se používá cefalexin a cefadroxil (Duracef). U injekční aplikace je to cefalotin a cefazolin (Vulmizolin) (Votava, 2001).

### **2.6.2.2 II. generace**

Druhá generace cefalosporinů působí proti dalším gramnegativním bakteriím, jako jsou *Haemophilus influenzae* (včetně kmenů, produkujících beta-laktamázu), *Moraxella catarrhalis* a zástupce anaerobních mikroorganismů *Bacteroides fragilis*. Jak již bylo popsáno výše, účinnost na grampozitivní koky je nižší, než u první generace. Perorálně se využívá cefuroxim axetil, který se po absorpci deesterifikuje na cefuroxim. Má delší biologický poločas, který umožňuje dávkování dvakrát denně a absorpce se zvyšuje, když se užívá s jídlem (u mnoha jiných perorálních antibiotik tomu tak není). Parenterálně se využívá cefuroxim, cefoxitin, cefamandol a cefamycín (Papadakis et al., 2018).

### **2.6.2.3 III. generace**

Cefalosporiny třetí generace mají ještě více rozšířené spektrum a větší účinnost na gramnegativní bakterie. Perorálně se podává cefixim, cefpodoxim a ceftibuten. Parenterálně se využívá cefotaxim, ceftazidim, ceftizoxim, ceftriaxon a cefoperazon. Ceftazidim je unikátní mezi těmito cefalosporiny tím, že je účinný proti *Pseudomonas aeruginosa* a rodům *Acinetobacter*, *Citrobacter* a *Enterobacter* (Papadakis et al., 2018).

Cefoperazon je také účinný proti *Pseudomonas aeruginosa*, ale méně stabilní k beta-laktamázám. Proto je používán v kombinaci s inhibitorem beta-laktamázy sulbaktamem, nazvaným co-cefoperazon (Sul-perazon). Jeho působení je účinné také na acinetobaktery (Votava, 2001).

Z dat uvedených ve zprávě Evropské sítě pro sledování antimikrobiální rezistence (EARS-Net) se uvádí, že v roce 2017 bylo zaznamenáno v Evropě 14,9 % kmenů *Escherichia coli* rezistentních k cefalosporinům 3. generace (Příloha č. 12). U kmenů

*Klebsiella pneumoniae* bylo zaznamenáno 31,2 % rezistentních k cefalosporinům 3. generace (Příloha č. 13). Celosvětový trend je tedy takový, že převažují spíše rezistentní kmeny *Klebsiella pneumoniae*. Česká republika je rovněž zapojena do projektu Evropské surveillance antibiotické rezistence, kde je také sledována rezistence k cefalosporinům u již výše zmíněných kmenů. V České republice v roce 2017 bylo zaznamenáno 53,2 % rezistentních kmenů *Klebsiella pneumoniae* k cefalosporinům 3. generace a 14,2 % u kmenů *Escherichia coli* (Surveillance of antimicrobial resistance in Europe..., 2018).

#### **2.6.2.4 IV. generace**

Cefalosporiny této generace jsou velmi dobře stabilní k beta-laktamázám. V porovnání se všemi ostatními cefalosporiny, mají lepší účinek na grampozitivní mikroorganismy, zejména stafylokoky. Proto se mohou využít i k léčbě smíšených infekcí, způsobených jak grampozitivními, tak gramnegativními bakteriemi. Jejich podání je pouze parenterální. K dispozici jsou dva druhy antibiotik, a to jsou cefpirom a cefepim (Votava, 2001).

#### **2.6.2.5 V. generace**

Pátou generaci tvoří dva cefalosporiny, a to ceftobiprol a ceftarolin. Jsou podávány pouze parenterálně a využívají se pro léčbu infekcí, způsobených bakterií meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Tato antibiotika jsou schopna vázat nativní PBP2a, což je protein vázající penicilin, kódovaný genem *mecA*, který je zodpovědný za rezistenci na meticilin a další penicilinová antibiotika (Greninger et al., 2016).

#### **2.6.3 Monobaktamy**

Do této skupiny se řadí pouze jedno klinicky používané antibiotikum, nazvané aztreonam. Základní stavební strukturou je jen beta-laktamový kruh, se schopností odolávat působení beta-laktamázy (Lincová a Farghali, 2007).

Aztreonam se podává parenterálně a jeho spektrum účinku je od ostatních cefalosporinů zaměřeno pouze na infekce, způsobené gramnegativními bakteriemi. Aplikuje se zejména u infekcí s problematickým průběhem, kde se nemohou k léčbě využít aminoglykosidová antibiotika jako např. při renálním selhání a chinolony např. u gravidity (Rozsypal, 2015).

#### **2.6.4 Karbapenemy**

Jedná se o moderní beta-laktamová antibiotika, jejichž antibakteriální účinnost je velmi vysoká a taktéž i spektrum účinku je extrémně široké. Vyznačují se i minimální toxicitou a organismus je většinou dobře snáší. Do této skupiny se řadí imipenem, meropenem, ertapenem a doripenem (Beneš, 2011).

Všechna tato antibiotika jsou podávána parenterálně. Jsou také využívána jako tzv. rezervní antibiotika a léky volby, neboť se řadí k posledním léčebným přípravkům, která lze ještě aplikovat u infekcí způsobených gramnegativními tyčkami s produkcí ESBL. Rezistence na karbapenemy je v současné době zatím spíše výjimečná, díky jejich velmi vysoké stabilitě k mnoha mechanismům rezistence (Rozsypal, 2015).

#### **2.6.5 Inhibitory beta-laktamáz**

Tyto inhibitory beta-laktamáz se řadí mezi skupinu antibiotik, která představují jednu z možností řešení a zabránění vzniku rezistence, způsobené beta-laktamázami. Mají schopnost ochránit hydrolyzovatelné betalaktamy právě před jejich inaktivací. Inhibitory jsou svou strukturou podobné beta-laktamovým antibiotikům a rozdělují se na dvě skupiny. Do první skupiny patří kyselina klavulonová, která je bez antibiotické aktivity. Druhou skupinu tvoří sulfony kyseliny penicilanové, sulbaktam a tazobaktam, které mají antibiotickou aktivitu omezenou. Důležitá vlastnost všech těchto inhibitorů spočívá v tom, že beta-laktamázy se k nim vážou daleko ochotněji (mají mnohem vyšší afinitu), než k beta-laktamovým antibiotikům. Nepoužívají se samostatně, pouze v kombinaci s jiným antibiotikem. Z toho vyplývá, že přítomnost inhibitoru rozšiřuje antibakteriální spektrum oproti samotnému antibiotiku, které by bylo třeba již rezistentní. Pokud je totiž současně aplikován inhibitor společně s beta-laktamovým antibiotikem, dojde k nevratné inaktivaci beta-laktamáz, které se vážou právě na inhibitor. Díky tomuto mechanismu je umožněno antibiotiku úspěšně plnit svou funkci a účinně tak likvidovat patogeny. Pro příklad sem patří antibiotika jako amoxicilin + kyselina klavulanová, piperacilin + tazobactam, ampicilin + sulbaktam (Švihovec et al., 2018).

#### **2.7 Beta-laktamázy**

Beta-laktamázy jsou bakteriální enzymy, které způsobují nejčastější formu rezistence proti již zmíněným beta-laktamovým antibiotikům. Jejich jediná, avšak zcela zásadní funkce, je hydrolyza beta-laktamového kruhu, což má za následek inaktivaci antibiotika, která se poté stávají vůči bakterii neúčinná (Beneš, 2018).

V důsledku používání cefalosporinů 3. a 4. generace v klinické praxi, došlo ke vzniku právě již zmíněných beta-laktamáz, schopné hydrolyzovat tato antibiotika. Velká skupina těchto enzymů je tvořena tzv. širokospektrými beta-laktamázi ESBL (Hrabák, 2007).

### 2.7.1 Klasifikace

Bakteriální beta-laktamázy jsou tříděny podle různých hledisek jako např. jestli jsou kódovány plazmidem nebo chromozomem, podle hydrolytického spektra a také podle rozdílné citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz. K těm nejvíce užívaným patří klasifikace Bushové-Jacoby-Medeirose a klasifikace podle Amblera (Kolář, 2007).

#### 2.7.1.1 Dle Bushové-Jacoby-Medeirose

Tato klasifikace rozděluje enzymy podle toho, jaký upřednostňují substrát a jak jsou citlivé k inhibitorům. Jsou popsány 4 skupiny:

**1. skupina:** V této skupině jsou zařazeny takové beta-laktamázy, které neinhibuje kyselina klavulanová. Většina z nich je kódována chromozomálně. Hlavní producenti této skupiny jsou enterobakterie a *Pseudomonas aeruginosa*.

**2. skupina:** Nejpočetnější skupina obsahující enzymy kódované plazmidy, které jsou většinou dobře inhibované kyselinou klavulanovou. Podle substrátu, který preferují, se dále dělí do podskupin. Patří sem širokospektré beta-laktamázy třídy A (ESBL).

**3. skupina:** Zástupcem této skupiny jsou metalo-beta-laktamázy, které ničí široké spektrum substrátů jako např. karbapenemy. Nepůsobí na aztreonam a nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou.

**4. skupina:** Zde jsou zahrnuty málo četné enzymy produkované např. druhem *Burkholderia cepacia* (Bush et al., 1995).

#### 2.7.1.2 Dle Amblera

Tato klasifikace beta-laktamáz vychází z jejich chemické struktury, konkrétně ze sekvence aminokyselin. Opět je rozdělení uzpůsobeno do 4 skupin, resp. tříd:

**Třída A:** Do této třídy beta-laktamáz patří takové, které jsou ve většině případů kódovány plazmidy. Nejpočetnější a nejčastěji produkované enzymy, vyskytující se u čeledi *Enterobacteriaceae*, jsou TEM-1,2 a SHV-1. Pokud dojde k mutaci genů kódujících tyto enzymy, a to především způsobenou substitucí jedné nebo více aminokyselin, dochází ke vzniku a rozšíření širokospektrých beta-laktamáz AmpA (ESBL). Enzymy, které zahrnuje skupina ESBL, jsou TEM, SHV a CTX-M.

**Třída B:** Skupina enzymů, které vynikají svou účinností na karbapenemy. Jsou zde zařazeny enzymy typu IMI, VIM, a další. Druhy jako *Stenotrophomonas maltophilia* a *Pseudomonas aeruginosa* jsou zástupci produkující tyto enzymy.

**Třída C:** Zahrnuje chromozomální beta-laktamázy typu AmpC. Přírodními producenty jsou *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., *Morganella morganii* a *Pseudomonas aeruginosa*. V posledních letech, a to zejména u druhů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*, jsou zaznamenány AmpC, které jsou ovšem kódované plazmidy.

**Třída D:** Do této třídy se řadí enzymy typu OXA. Mezi zástupce producentů těchto enzymů patří rod *Aeromonas* sp. a nefermentující bakterie. Vyskytují se zde také některé OXA beta-laktamázy, jejichž produkce je známá u *Pseudomonas aeruginosa* a patří mezi ESBL (Ambler, 1980).

### 2.7.2 Širokospektré beta-laktamázy typu ESBL

Jedná se o enzymy, které jsou produkovány nejčastěji gramnegativními tyčkami z čeledi *Enterobacteriaceae*. Mají schopnost hydrolyzovat peniciliny, všechny generace cefalosporinů a monobaktamy. Tímto mechanismem způsobují jejich ztrátu účinnosti. Jsou inhibovány díky inhibitorům beta-laktamáz (kyselina klavulanová, sulbaktam, tazobaktam (Hrabák, 2007).

Avšak při použití beta-laktamových v kombinaci právě s inhibitory beta-laktamáz, může často jejich účinek selhávat. Další problém u bakterií produkujících ESBL spočívá ve vytvoření rezistence i k jiným skupinám antibiotik, jako například fluorochinolonům, aminoglykosidům, tetracyklinům a kotrimoxazolu. Tím dochází opět ke ztížení léčby (Schwaber et al., 2005).

První bakterie, produkující rozšířené spektrum  $\beta$ -laktamáz byly poprvé detekovány v západní Evropě v polovině osmdesátých let. Od té doby se jejich výskyt neustále zvyšuje. Nejpočetnější skupinou ESBL představují beta-laktamázy TEM a SHV, které jsou zaznamenávány rovněž od 80. let. Mezi nejčastějšími bakteriálními kmeny, u kterých jsou detekovány tyto TEM a SHV enzymy, se řadí kmeny *Klebsiella pneumoniae* a kmeny *Escherichia coli*. Novější skupinu ESBL představují enzymy skupiny CTX-M, hydrolyzující především cefotaxim. Frekvence výskytu této skupiny se v posledních letech významně zvyšuje. Již v mnoha zemích převažují kmeny s produkcí těchto enzymů. Nejvýznamnějším bakteriálním kmenem produkující CTX-M je *Escherichia coli*, a to včetně izolátů z komunitního prostředí (Bradford, 2001).

### **3. Cíle práce a hypotézy**

#### **3.1 Cíle práce**

Cílem této práce bylo osvojit si mikrobiologickou techniku při zpracování klinického materiálu, diskovou difuzní metodu a metodu stanovení minimální inhibiční koncentrace pro určení citlivosti k antimikrobiálním látkám a také metodu průkazu ESBL. Dále zjistit počet kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL za časový úsek 5 let a rovněž vývoj antibiotické rezistence u těchto kmenů v moči. Dalším cílem bylo porovnat výskyt a jednotlivé zastoupení těchto dvou kmenů s produkcí ESBL podle nemocničních oddělení a v různých typech klinického materiálu.

#### **3.2 Hypotézy**

1. Předpokládám, že s narůstajícím časem stoupá i počet kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL.
2. Předpokládám, že nejčastějším producentem ESBL bude *Klebsiella pneumoniae*.
3. Předpokládám, že největší počet producentů ESBL bude v klinickém materiálu sputum.
4. Předpokládám, že největší počet producentů ESBL bude na interním oddělení.



## 4. Metodika

V mé bakalářské práci jsem využila data získaná z provedených metod, na kterých jsem pracovala od 1. 1. 2018 do 31. 12. 2018 na Oddělení lékařské mikrobiologie Nemocnice Prachatic, a. s. Z databáze laboratorního informačního systému od firmy STAPRO se systémem OpenLIMS jsem použila ještě data z roku 2014 až 2017 pro zhodnocení počtu kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL, jakožto nejčastějších producentů těchto širokospektrých beta-laktamáz. Data byla rovněž využita pro zhodnocení vývoje antibiotické rezistence u těchto kmenů v moči v období 5 let, protože právě v tomto typu materiálu jsem zaznamenala největší počet producentů ESBL. Pokud došlo k izolaci rodu *Escherichia* a rodu *Klebsiella* z biologického materiálu, zhotovila jsem ENTEROtest 24 N pro následné přesné určení bakteriálního kmene. Dále jsem si vyzkoušela diskovou difuzní metodu a metodu stanovení minimální inhibiční koncentrace pro testování mikrobů na citlivost k vybraným antimikrobiálním látkám. V případě rezistence jsem zjišťovala ještě jejich možnou produkci ESBL. Bakterie byly izolovány z klinického materiálu, který byl přijat na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Prachatic, a.s. Pro svou práci jsem si vybrala klinický materiál, ze kterého byly zachyceny producenti ESBL kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae*. U každého jednotlivého klinického materiálu jsem popsala postup při jeho zpracování.

### 4.1 Postup při zpracování klinického materiálu

Každý vzorek, který byl doručen do laboratoře, musel být řádně označen ke správné identifikaci a musela být k němu přiložena žádanka o mikrobiologické vyšetření. Ta byla zkontrolována laborantkou, zda obsahuje všechny potřebné údaje jako např. jméno a příjmení, identifikační číslo pojištěnce, zdravotní pojišťovna, diagnóza, datum a čas odběru, razítko žadatele, druh materiálu a typ vyšetření,...).

Pokud vše ze zmíněných bodů bylo splněno, vzorek byl přijat. Přijatý vzorek znamená, že se na žádanku přidalo datum a čas přijetí laboratoří a podpis laborantky, která materiál přijala a je zodpovědná za správnost přijatého materiálu.

Poté byly vzorky očíslovány. Systém byl takový, že moče se značily písmenem M, příslušným číslem a při číslování pūd se celé číslo podtrhávalo. To proto, aby nemohlo dojít k záměně pūdy rozočkované moči s jiným klinickým materiálem, kde se tato stejná pūda mohla také použít. Ostatní klinický materiál se značil písmenem K a příslušným číslem bez podtržení.

Veškerý klinický materiál byl zpracován podle standardních operačních postupů laboratoře. Po zpracování byl materiál uložen do termostatu, kde se nechal kultivovat. U běžných půd jako krevní agar (Columbia agar), Mueller-Hintonův agar, Endův agar, UriSelect, Sabouradův agar trvala kultivace  $18\pm 2$  hodiny při teplotě  $36\pm 1$  °C. Půdy jako čokoládový agar a NGO vyžadují mikroaerofilní prostředí a kultivují se také  $18\pm 2$  hodiny při teplotě  $36\pm 1$  °C. Půdy Schaedler se kultivují při teplotě  $36\pm 1$  °C po dobu 48 hodin a vyžadují anaerobní prostředí. Podrobněji bude popsáno u materiálu punktát.

Druhý den ráno bylo provedeno lékařem zhodnocení kultivací. Mohly nastat tři možnosti. Zprvce se mohlo jednat o negativní výsledek, tedy bez nárůstu kolonií. Zadruhé se mohlo jednat o běžnou mikrobiální flóru, tedy bez patogenních mikroorganismů a zatřetí o pozitivní nález mikroba, se kterým se pak dále pracovalo. Mikrob se mohl identifikovat např. pomocí různých biochemických testů a byla také zhotovena citlivost k antimikrobiálním látkám pomocí diskové difuzní metody.

#### **4.1.1 Moč**

Vzorek moči je těsně před zpracováním lehce promíchán ve sterilní zkumavce. K samotnému zpracování je potřeba sterilní jednorázová kalibrovaná klička o objemu 10  $\mu$ l. Ta se ponoří kolmo do vzorku moči těsně pod povrch a vytáhne se. Poté dochází k inokulaci UriSelectu, a to tak, že středem misky se provede svislá čára shora dolů (inokulum), kam se vyprázdní veškerý obsah kličky. Stejnou kličkou se provede v kolmém směru rozočkování inokula po celé ploše půdy. Výsledné rozočkování připomíná tvar stromečku. Naočkované půdy se seřadí vzestupně podle čísel a uloží se do termostatu. Jak již bylo zmíněno, ke kultivaci se používají diagnostické půdy UriSelect od firmy BIO-RAD. Jedná se o neselektivní chromogenní agarové půdy, které podle barvy dokáží alespoň přibližně určit mikroba.

*Po inkubaci se počítají vyrostlé kolonie a výsledek se vyjadřuje počtem tzv. CFU (z angl. colony-forming unit) na 1 ml (Votava, 2001, s. 231).*

Laboratorní nález  $>10^5$  CFU značí již významnou bakteriurii (Bryan, 2015).

#### **4.1.2 Sputum**

Zpracování sputa se provádí v laminárním boxu, protože se jedná o tekutý materiál. Do laboratoře je transportováno v širší zkumavce zvané „sputovka“.

K základní kultivaci se používají tyto půdy: Columbia agar s příměsí 5% beraní krve, Endův agar a čokoládový agar. Rozočkovaný vzorek na krevním agaru se přeškrťává

kolmo k inokulu přes celý agar laboratorním kmenem *Staphylococcus aureus* CCM 4223, který vytvoří hemolýzu pro případný záchyt hemofilů tzv. satelitního růstu. Nad stafylokokovou čáru mimo inokulum do rozočkované plochy se položí disk optochinu.

Optochin je látka, která umožňuje rozpouštět pneumokoky, ale ostatní viridující streptokoky nijak nerozpouští. Jestliže se jedná o *Streptococcus pneumoniae*, vytvoří se okolo optochinového disku viditelná zóna úplné inhibice růstu, zatímco ostatní  $\alpha$ -hemolytické streptokoky rostou až k okraji disku (Carey et al., 2011).

Endův agar je selektivní a má tu vlastnost, že na něm nerostou grampozitivní koky, tudíž slouží k diferenciaci gramnegativních tyček, především enterobakterií. Čokoládový agar se zde využívá pro kultivaci rodů *Haemophilus* a kultivuje se v mikroaerofilním prostředí. Pokud je podezření na kvasinkové organismy přidává se ještě Sabouraudův agar. Nakonec se zhotovuje preparát, který je barven dle Grama a je čten lékařem (Votava et al., 2000).

#### **4.1.3 Rána**

Stěry z rán přicházejí do laboratoře v odběrových soupravách na vatovém tamponku s transportní půdou Amies. Mezi tyto typy výtěrů řadíme sekret z jakékoliv rány. Jedná se nejen o chirurgické rány, ale také rány z dekubitu či bércového vředu. Proto je velmi důležitý i výběr půd. Jako základní půdy se používají Columbia agar s příměsí 5% beraní krve a Endův agar. K rozšířené kultivaci např. pro kvasinkové organismy a plísň se používá Sabouraudův agar. U bércových vředů a dekubitů se většinou nachází více druhů mikrobů. Proto se navíc přidává půda UriSelect, která dokáže barevně odlišit různé druhy bakterií, čímž se pak odečítajícímu lékaři usnadní identifikace mikroba. Dále se zhotovuje preparát, který je obarven podle Grama. Jako poslední krok se výtěrový tampon několikrát ponoří do thioglykolátové pomnožovací půdy. Tato tekutá půda slouží k pomnožení již malého množství mikroba. Pokud lékař druhý den zaznamená v této půdě zákal, který značí přítomnost mikroba, je pomnožovací půda vyočkována na Columbia agar a druhý den odečtena (Votava et al., 2000).

#### **4.1.4 Hemokultura**

Hemokultura je zlatým standardem pro hledání příčin infekce krve. Identifikace bakterií a plísni pomocí hemokultury je nezbytná u pacientů se sepsí pro správnou léčbu a výběr vhodných antimikrobiálních látek (Abdollahi et al., 2014).

Krev přichází do laboratoře v hemokultivačních lahvičkách, které jsou aerobní (Bactec Plus Aerobic/F), anaerobní (Bactec *Lytic/10* Anaerobic/F) a přímo určené pro děti tzv. pediatrické (Bactec Peds Plus/F).

Odběr krve na hemokultivaci se musí provést za aseptických podmínek, aby nedocházelo ke kontaminacím a tudíž i falešné pozitivitě. Krev se obvykle odebírá u dospělých do dvou lahviček. První je určena k růstu aerobních mikroorganismů a druhá pro růst anaerobní. Každá lahvička musí být opatřena štítkem z oddělení se jménem a rodným číslem pacienta. Štítek nesmí na lahvičce zakrývat čárový kód, protože systém Bactec by ji nenačet a nemohla by být přijata k hemokultivaci. Do aerobní i anaerobní lahvičky se odebírá 8-10 ml krve. U dětí se odebírá pouze jedna hemokultura s objemem krve 4-5 ml. Odběr je vhodné opakovat 2-3 krát v intervalu 15-30 minut (Vytečková, 2013).

Pro případné odhalení kontaminace krve při odběru se doporučuje provést stěr z kůže v místě odběru po jeho dezinfekci a před vlastním odběrem krve. Tento stěr v transportní půdě se zasílá společně s příslušnou hemokulturou a kultivuje se na krevním agaru a v pomnožovací půdě.

Kultivační vyšetření krve probíhá v automatizovaném hemokultivačním systému Bactec 9050 Becton Dickinson s maximálním obsahem 50 hemokultur.

Přístroj Bactec 9050 slouží pro rychlou detekci mikroorganismů v hemokulturách. Testovací vzorek se inokuluje do lahvičky, která je vložena do Bactecu k inkubaci a pravidelnému odečítání. Každá lahvička obsahuje čidlo, které detekuje nárůst CO<sub>2</sub>, který je produkován růstem mikroorganismů. Přístroj monitoruje zvýšenou fluorescenci pomocí čidla každých deset minut, která je přímo úměrná množství přítomného CO<sub>2</sub>. Pozitivní odečítání znamená, že se v lahvičce pravděpodobně nachází životaschopné mikroorganismy (Cohen, 1998).

Přístroj je naprogramován na 7 dní kultivace. Pokud není detekována pozitivita hemokultury do 7 dnů od jejího vložení, je přístrojem vyřazena jako negativní bez zvukového signálu.

Pokud přístroj vyhodnotí hemokulturu jako pozitivní, ozve se zvukový signál, který se v pravidelných intervalech opakuje až do té doby, dokud není hemokultura vyjmuta. Na hemokulturu se napíše datum positivity. Poté nastává samotné zpracování v laminárním boxu. Nejdříve se provede dezinfekce víčka hemokultury. Po zaschnutí dezinfekce se zasune sterilní injekční jehla do lahvičky a nabere se malé množství krve potřebné pro zhotovení mikroskopického preparátu, který je barven dle Grama. Lékař

na základě mikroskopického nálezu určí, na které půdy bude krev naočkována a také určí vhodnou sestavu antibiotických disků pro zjištění citlivosti. Základními půdami jsou Columbia agar s příměsí 5% beraní krve a Endův agar. Columbia agar se navíc ještě přeškrťává laboratorním kmenem *Staphylococcus aureus* CCM 4223.

#### 4.1.5 Punktát

U těchto vzorků rozlišujeme, z jaké části těla byl punktát odebrán. První skupinu tvoří punktáty z kloubů a hrudníku. Kultivují se na Columbia agaru s příměsí 5% beraní krve a Endově agaru. Na čokoládovém agaru se zachycuje případný růst hemofilů. Další půdou je selektivní agar pro kultivaci *Neisseria gonorrhoeae* (NGO). Dále pak Schaedlerův agar, který zachycuje růst anaerobních bakterií.

Druhou skupinu tvoří punktáty z dutiny břišní a žlučníku. Zde se ke kultivaci využívá Columbia agar s příměsí 5% beraní krve, Endův agar, Schaedlerův agar a deoxycholát-citrátový agar pro růst rodů *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*.

Čokoládový agar společně s NGO agarem se kultivují v průhledných foliových obalech v mikroaerofilním prostředí, tedy se zvýšenou tenzí CO<sub>2</sub> při teplotě 36±1°C do druhého dne (18-20 hodin). Schaedlerův agar se kultivuje anaerobně při teplotě 36±1°C po dobu 48 hodin v polopřehledných zlatých foliových obalech, do kterých se přidává katalyzátor a diagnostický proužek pro kontrolu anaerobního prostředí. Tyto specifická prostředí jsou vytvořena v Látalově anaerobním systému, pomocí dvou tlakových bomb s příslušným plynem. První obsahuje jen CO<sub>2</sub> pro mikroaerofilní kultivaci a druhá bomba pro anaerobní kultivaci je tvořena směsí plynů 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> a 10% H<sub>2</sub>.

Zpracování punktátů probíhá v laminárním boxu. Vzorek je sterilním vatovým tamponem naočkován na výše zmíněné půdy, provede se nátěr na sklíčko, které se barví dle Grama. Nakonec se malé množství punktátu přeneso do thioglykolátové pomnožovací půdy. Pokud se jedná o punktát z břišní dutiny a žlučníku, přeneso se část i do selenitové pomnožovací půdy, která podporuje růst kmenů *Salmonella* a inhibuje růst ostatních bakterií. Tato tekutá půda se druhý den vyočkovává na deoxycholát-citrátový agar.

#### 4.1.6 Pochva

Mezi běžné kultivační půdy pro výtěr z pochvy patří Columbia agar s příměsí 5% beraní krve, Endův agar a Sabouraudův agar pro růst kvasinkových organismů. Zhotovuje se preparát, který je obarven dle Grama. Pokud je podezření na přítomnost *Neisseria*

*gonorrhoeae*, kultivace probíhá na předeřátém Columbia agaru a selektivním agaru NGO. U *Neisseria gonorrhoeae* jsou potřeba preparáty dva. Jeden je barven dle Grama (fixace plamenem) a druhý dle Giemsy (fixace methanolem). Nakonec se výtěrový tampon několikrát ponoří do thioglykolátové pomnožovací půdy.

Lékař se také zaměřuje na možný nález *Streptococcus agalactiae*, a to hlavně u těhotných žen.

#### **4.1.7 Kanyla**

Kanyly přichází do laboratoře ve sterilních zkumavkách. Každá kanyla by měla mít délku do 5 cm. Pokud je delší, musí být sterilně zkrácena. Ke kultivaci se používá Columbia agar s příměsí 5% beraní krve a Endův agar. Kanyla se opatrně přenesse pomocí sterilní pinzety ze zkumavky na zmíněné půdy. Mírnými poklepy ruky o stěnu Petriho misky se kanyla několikrát posouvá po půdě. Nakonec se vrátí zpět do původní zkumavky a zalije se pomnožovací thioglykolátovou půdou.

### **4.2 Biochemická identifikace**

Vzájemná identifikace mikrobů na biochemické úrovni spočívá v testování různých biochemických testů. Identifikace je založena na tom, že každý druh mikroba produkuje jiné enzymy, které jim slouží např. k štěpení živin. Produkci svých metabolitů dochází pak ke změně barevnosti půdy (Votava et al., 2000).

#### **4.2.1 ENTEROtest 24 N**

Souprava ENTEROtest 24 N je určena pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, vibrií a aeromonád bez použití činidel (Erba Lachema ENTEROtest 24 N – příbalový leták, 2018).

Tato komerční souprava obsahuje mikrotitrační destičku s 24 jamkami (tři řádky po 8 jamkách). Dno každé jamky obsahuje jinou půdu v suchém stavu. V každé jamce tak probíhá jiná biochemická reakce jako např. fermentace různých cukrů, tvorba indolu, sirovodíku, štěpení urey a další testy. Pro přehlednost se každý test označuje zkratkami třech písmen např. GLU je zkratka pro štěpení glukózy nebo IND značí tvorbu indolu. Po doporučené době kultivace, většinou druhý den, se přítomnost bakterií prokáže tím, že v jednotlivých jamkách vlivem růstu mikroba dochází k produkci jeho metabolitů, které pak změni barvu půdy (Votava et al., 2000).

## **Pracovní postup**

1. Set s mikrotitrační destičkou se vyndá z lednice a nechá se vytemperovat na pokojovou teplotu.
2. Připravíme si fyziologický roztok o objemu 3 ml.
3. Bakteriologickou kličkou vybereme izolované kolonie bakterií a vnášíme je do fyziologického roztoku, aby se vytvořil zákal 1 McF. Stupeň zákalu je měřen na Densi-LA-Metru.
4. Mikrotitrační destičku popíšeme laboratorním číslem vzorku. Do každé z jamek se kape 100  $\mu$ l z připravené suspenze.
5. Do pěti jamek prvního řádku, označené D-H se přidávají 2 kapky sterilního parafinového oleje. Ten vytváří v konkrétní jamce anaerobní prostředí, protože některé biochemické reakce probíhají pouze anaerobně.
6. Takto vyplněná destička se přikryje víčkem, vloží se do sáčku a nechá se kultivovat v termostatu při teplotě 37°C po dobu 24 hodin (Příbalový leták – ENTEROtest 24 N, 2018).

## **Interpretace**

Lékař hodnotí barevné změny pŕd podle barevné škály dodávané se soupravou (Příloha č. 2) a zaznamenává je do bločků. Negativní reakce je značena symbolem minus a pozitivní reakce plus. K vyhodnocení slouží počítačový software TNW (verze 7.0), do kterého se zadají symboly z bločku a program v procentech vyhodnotí, o který bakteriální druh se pravděpodobně jedná.

### **4.2.1.1 Indol test**

Tento doplňkový biochemický test se zhotovuje ke každému ENTEROtestu 24 N.

Používá se k rozlišení jednotlivých druhů bakterií z rodiny enterobakterií. Test je založen na schopnosti organismu rozkládat esenciální aminokyselinu tryptofanu a produkovat tak indol, pyruvát a amoniak. Produkce indolu se detekuje přidáním p-dimethyl-aminobenzaldehydu zvaného Kovácsovo činidlo (Vashist et al., 2013).

Zkouška na tvorbu indolu probíhá tak, že se na kličku nabere testovaný kmen a rozsuspenduje se v tekuté pŕd s tryptofanem. Uloží se do termostatu a nechá se inkubovat 18-24 hodin při teplotě 36 $\pm$ 1 °C. Druhý den se přidá 5 kapek Kovácsova činidla. Pokud je přítomen indol, dojde ke zčervenání nakapaného činidla. Pokud indol přítomen není, činidlo zůstává v původní žluté barvě (Příloha č. 3).

#### 4.2.1.2 *Escherichia coli*

Tab. 1: Identifikační tabulka ENTEROtestu 24 N s typickými výsledky biochemických reakcí kmenů *Escherichia coli* (Data převzatá z: Erba Lachema ENTEROtest 24 N – příbalový leták, 2018).

<i>Escherichia coli</i>	Zkratka testu							
1. řádek	URE	ARG	ORN	LYS	H <sub>2</sub> S	SCI	MAL	ONP
	-	(-)	d	(+)	-	-	-	d
2. řádek	SAL	SOR	MLB	CEL	LAC	TRE	MAN	GLR
	d	(+)	d	-	d	+	+	(+)
3. řádek	DUL	ADO	ART	SUC	INO	RAF	ESL	bXY
	d	-	-	d	-	d	d	-

Legenda: + pozitivní reakce, (+) většinou pozitivní reakce, - negativní reakce,  
(-) většinou negativní reakce, d - variabilní reakce

Indol test: většinou pozitivní reakce

Zhotovený test je zobrazen v Příloze č. 1.

#### 4.2.1.3 *Klebsiella pneumoniae*

Tab. 2: Identifikační tabulka ENTEROtestu 24 N s typickými výsledky biochemických reakcí kmenů *Klebsiella pneumoniae* (Data převzatá z: Erba Lachema ENTEROtest 24 N – příbalový leták, 2018).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Zkratka testu							
1. řádek	URE	ARG	ORN	LYS	H <sub>2</sub> S	SCI	MAL	ONP
	+	-	-	+	-	+	(+)	+
2. řádek	SAL	SOR	MLB	CEL	LAC	TRE	MAN	GLR
	+	+	+	+	+	+	+	-
3. řádek	DUL	ADO	ART	SUC	INO	RAF	ESL	bXY
	d	(+)	+	+	+	+	+	(+)

Legenda: + pozitivní reakce, (+) většinou pozitivní reakce, - negativní reakce,  
(-) většinou negativní reakce, d - variabilní reakce

Indol test: negativní reakce

Zhotovený test je zobrazen v Příloze č. 1

#### 4.3 Zjišťování citlivosti k antimikrobiálním látkám

K základním metodám, které umožňují zjistit citlivost k antimikrobiálním látkám, se řadí kvalitativní průkaz citlivosti a kvantitativní stanovení citlivosti. Stále nejběžněji užívanou metodou, patřící mezi kvalitativní, je diskový difuzní test. U kvalitativního



stanovení citlivosti se většinou využívá diluční metoda, u které se stanovuje minimální inhibiční koncentrace (MIC) konkrétního antibiotika pro vyšetřovaný kmen mikroba (Votava, 2001).

#### **4.3.1 Diskový difúzní test**

Diskový difúzní test je jednou z nejstarších kvalitativních metod pro stanovení citlivosti antimikrobiálních látek. Stále však zůstává nejrozšířenější používanou metodou v rutinních mikrobiologických laboratořích. Metoda je všestranná v tom, že je vhodná pro testování většiny bakteriálních kmenů a lze i vyšetřovat téměř všechny antimikrobiální látky a také nevyžaduje žádná speciální přístrojová vybavení (Ronald a Jones, 1992; Woods, 1995).

Pro provedení této metody jsou zapotřebí antibiotické disky. Jedná se o papírové disky napuštěné určitým antibiotikem. Pokládají se buď jednotlivě ručně pomocí sterilní jehly nebo dispensorem, který obsahuje 6 pozic pro jednotlivá antibiotika, která se stlačením přitisknou na agar. Antibiotický disk ihned po přiložení na agar začne působit, tzn. že se začne uvolňovat antibiotikum. Proto je důležité disk správně položit a lehce přitlačit k agaru sterilní jehlou, aby se zabránilo jeho posunutí nebo spadnutí z agaru. Tato metoda, jak vyplývá z názvu, využívá antibiotický disk a difuzi. Antibiotikum difunduje z disku agarem a jeho koncentrace se k okrajům misky snižuje (Votava et al., 2000).

Princip tesu je takový, že pokud přítomný mikrob nevyroste okolo antibiotického disku, dojde k vytvoření tzv. inhibiční zóny (Votava, 2001).

Vytvořená inhibiční zóna se porovnává s hraničním průměrem zóny referenčního citlivého kmene stejného druhu mikroba. Mikrob je citlivý k antibiotiku, pokud je průměr inhibiční zóny větší nebo stejný se zónou, kterou tvoří referenční kmen. Pokud je naměřený průměr inhibiční zóny menší, jedná se o kmen rezistentní (Votava et al., 2000).

Hraniční koncentrace, tj. minimální účinná koncentrace antibiotika, je označována také jako breakpoint. Tyto breakpointy rozhodují o citlivost či rezistenci daného mikroba a jsou stanovené evropskou institucí EUCAST, což je zkratka pro European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019).

K vyšetřování citlivosti u běžných rychle rostoucích bakterií se využívá Mueller-Hintonův agar (Příloha č. 6). Pro stanovení citlivosti např. streptokoků či pneumokoků se využívá Mueller-Hintonův agar s příměsí 5% defibrinované koňské krve.

## **Pracovní postup**

1. Z primokultury se snažíme vybrat vždy čisté kolonie bakterií, aby citlivost byla přesná a nedošlo k testování smíšených kolonií.
2. V objemu 2-3 ml fyziologického roztoku připravíme suspenzi vybraných bakterií. Suspenze musí mít hodnotu zákalu 0,5 McFarlanda, který je měřen na Denzi-La-Metru. Tato připravená suspenze musí být přenesena na testovací agar, a to do 15 minut.
3. Do inokula se ponoří sterilní vatový tampon. Tím se inokulum rovnoměrně rozetře po celé ploše agaru. Miska se pootočí a inokulum se znovu jednotlivými tahy roztírá. Po dokončení se agar nechává zaschnout.
4. Poté dochází k aplikaci antibiotických disků pomocí dispenzoru nebo ručně sterilní jehlou, nejdéle však do 15 minut od zaschnutí agaru s rozetřeným inokulem.
5. Takto hotový agar s položenými disky je nutné nejpozději do 15 minut přenést do termostatu při teplotě  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  a nechat kultivovat  $18\pm 2$  hodiny dnem vzhůru (EUCAST, 2019).

## **Interpretace**

Druhý den lékař měří průměr inhibiční zóny kolem antibiotických disků posuvným měřítkem a porovnává je s již zmíněnými breakpointy. Podle velikosti IZ lékař stanoví antimikrobiální látku jako citlivou nebo rezistentní.

### **4.3.2 Diluční mikrometoda (MIC)**

U všech mikrobů izolovaných z likvoru, krve a dalších tělních tekutin, které jsou za běžných okolností sterilní, je nutné dávat přednost stanovení citlivosti pomocí diluční metody. Výsledek této metody totiž zajistí lékaři vybrat správnou antimikrobiální látku a její dávkování. Slouží k přesnému stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiální látky u bakteriálního kmene. MIC se běžně udává v jednotkách mg/l nebo  $\mu\text{g/ml}$ . Jedná se o nejnižší koncentraci antimikrobiální látky v příslušném médiu, která ještě dokáže zabránit růstu vyšetřovaného bakteriálního kmene (Votava, 2000).

Ke stanovení MIC se používá mikrotitrační destička obsahující 96 jamek. Na dně jamek jsou dehydratované antimikrobiální látky, které tvoří sestupný koncentrační gradient. Stanovuje se MIC 12 antibiotik v 8 možných koncentracích pro jeden bakteriální kmen (Příloha č. 11).

Pro tuto práci byly použity komerční sety od firmy DIAGNOSTICS s.r.o., konkrétně sety pro *Enterobacteriae* MIC GN 1, MIC GN 2.

### **Pracovní postup**

1. Set s mikrotitrační destičkou se vyndá z lednice a nechá se vytemperovat na pokojovou teplotu.
2. Z čisté kolonie bakterií narostlé 18-24 hodin setřeme bakteriologickou kličkou několik jednotlivých kolonií a vneseme je do zkumavky s obsahem 2 ml fyziologického roztoku.
3. Vytvoříme zákal, který musí odpovídat 0,5 McF a měříme ho na Denzi-La-Metru.
4. Z této připravené suspenze přeneseme 60  $\mu$ l do suspenzního media a po důkladné homogenizaci je suspenze připravena k použití.
5. Suspenzi přelijeme do sterilní plastové nádoby.
6. Inokulace se provádí osmikanálovou pipetou, kdy se vnáší 100  $\mu$ l suspenze z nádoby najednou do osmi jamek. Postupně se tímto způsobem naplní celá mikrotitrační destička.
7. Naplněná destička se vloží do inkubačního sáčku, který se uzavře. Vloží se do termoboxu a nechá se inkubovat při teplotě  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  po dobu  $18\pm 2$  hodiny (Příbalový leták MIC GN 2, 2018).

### **Interpretace**

Lékař druhý den hodnotí vizuální změnu zbarvení objemu jamek mikrotitrační destičky. Jamky, kde mikroorganismus neroste, tudíž daná koncentrace antimikrobiální látky na mikroorganismus působí a je tedy citlivá, mají fialovou barvu. Pokud jsou jamky zbarveny růžově, znamená to, že mikroorganismus v jamce roste, tudíž daná koncentrace antimikrobiální látky mikroba nijak neovlivní a je tedy rezistentní. Jako hodnota MIC se odečítá první jamka, která je barevně odlišná a tvoří přechod z růžové do fialové barvy. Jamka v pozici H 12 (jamka protínající poslední sloupec a poslední řádek destičky) je označována jako K a je důležitá pro kontrolu růstu mikroba. Pro validní výsledek musí být jamka vždy zbarvena růžově, což signalizuje správný růst mikroba i v ostatních jamkách (Příloha č. 10).

#### **4.4 Vyhledávání kmenů produkujících ESBL**

Za základní screening producentů ESBL se považuje buď disková difuzní metoda s příslušnými antibiotickými disky, podle které se měří průměry inhibičních zón kolem

disků, nebo hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) beta-laktamových antibiotik (Urbášková, 1998).

Pokud izoláty vykazují rezistenci alespoň k jednomu testovanému antibiotiku projevenou tím, že mají alespoň jednu hodnotu inhibiční zóny nižší (nebo MIC vyšší), než je hodnota hraniční, je kmen podezřelý na produkci ESBL. V tomto případě by měly být použity tzv. fenotypové potvrzující testy (Rawat a Nair, 2010).

#### **4.4.1 MASTDISC AmpC a ESBL detekční set (D68C)**

Jedná se o kombinovaný screeningový fenotypový test, který umožňuje detekovat produkci beta-laktamázu s rozšířeným spektrem (ESBL) a současně i detekci AmpC.

Produkci ESBL i AmpC lze prokázat porovnáním inhibiční zóny vytvořené kolem samotného cefalosporinu 3. generace, v tomto případě cefpodoximu, s inhibičními zónami cefpodoximu s inhibitory. Inhibitor ESBL je zde kyselina klavulanová a inhibitor AmpC kloxacilin (Performance standards..., 2006).

Set obsahuje 4 cartridge a každá z nich je tvořena 50 detekčními disky. Jednotlivé cartridge jsou označeny A, B, C, D, a stejně tak i disky, které obsahují.

Disk A obsahuje 10 µg cefpodoximu jako screeningového činidla, disk B 10 µg cefpodoximu a klavulanátu jako inhibitoru ESBL, disk C 10 µg cefpodoximu a kloxacilinu jako inhibitoru AmpC a disk D obsahuje 10 µg cefpodoximu v kombinaci obou inhibitorů klavulanátu s kloxacilem (Nourrisson et al., 2015).

#### **Pracovní postup**

1. Z primokultury vybereme čisté kolonie bakterií.
2. Připravíme suspenzi z vybraných kolonií v objemu 2 ml fyziologického roztoku a zákalu 0,5 McFarlanda. Zákal je měřen na Denzi-La-Metru.
3. Tuto vytvořenou suspenzi (inokulum) je nutné přenést na Mueller-Hintonův agar do 15 minut.
4. Do inokula se ponoří sterilní vatový tampon, kterým se rovnoměrně rozetře suspenze po celém povrchu testovacího agaru. Poté se miska pootočí a inokulum se znovu rovnoměrně rozetře a nechá se zaschnout.
5. Do 15 minut po zaschnutí agaru se musí položit detekční disky. Pokládáme je jednotlivě sterilní jehlou v přesně určeném pořadí a v dostatečné vzdálenosti od sebe, aby došlo k vytvoření inhibičních zón.

6. Hotový testovací agar s čtyřmi položenými detekčními disky je nutné nejpozději do 15 minut přenést do termostatu při teplotě  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  a nechat kultivovat 18-24 hodin dnem vzhůru (Příbalový leták - MASTDISCS® *Combi AmpC and ESBL detection discs*, 2018).

### **Interpretace**

Druhý den lékař porovnává průměry inhibičních zón A, B, C a D v přesně určeném pořadí (Příloha č. 7).

Jestliže je rozdíl inhibičních zón  $D-C \geq 5$  mm ale rozdíl  $B-A < 5$  mm, tak organismus vykazuje kombinaci ESBL a AmpC aktivity. Když jsou každý z rozdílů B-A a  $D-C < 5$  mm a  $D-B$  a  $C-A \geq 5$  mm, tak organismus vykazuje AmpC aktivitu. Pokud jsou každý z rozdílů B-A a  $D-C \geq 5$  mm a každý z rozdílů  $D-B$  a  $C-A < 5$  mm, organismus vykazuje ESBL aktivitu (Příloha č. 8). Jestliže jsou všechny zóny ve vzdálenosti do 2 mm od sebe (Příloha č. 10), organismus nevykazuje ani ESBL ani AmpC aktivitu (Nourrisson et al., 2015).

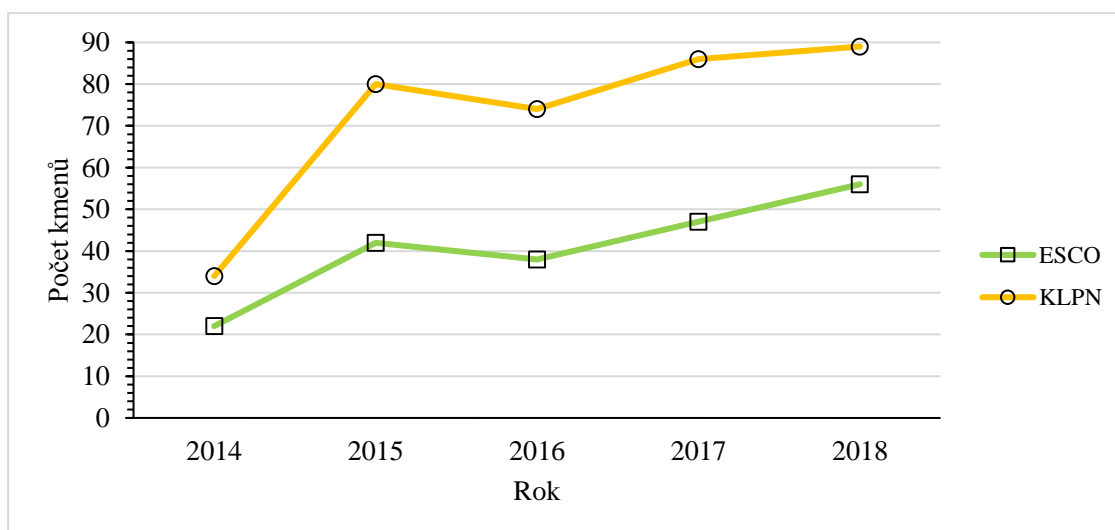
## 5. Výsledky

Na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Prachatice, a.s. v roce 2018 jsem zaznamenala celkem 1575 izolátů *Escherichia coli* v klinickém materiálu a z tohoto počtu se jednalo o 56 izolátů *Escherichia coli* s produkcí ESBL. Dále jsem zaznamenala celkový počet 511 izolátů *Klebsiella pneumoniae* v klinickém materiálu a z toho 65 izolátů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL. Z databáze laboratorního informačního systému od firmy STAPRO s.r.o. se systémem OpenLIMS jsem ze získaných dat z roku 2014 až 2017 zjistila celkový počet kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* a rovněž jsem zjistila počet těchto izolátů s produkcí ESBL. Jejich výskyt a zastoupení v jednotlivých letech je shrnutý v tabulce 3. Vývoj výskytu těchto producentů ESBL v roce 2014 až 2018 zobrazuje obrázek 1.

Tab. 3: Celkový počet výskytu kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* včetně produkce ESBL v letech 2014–2018.

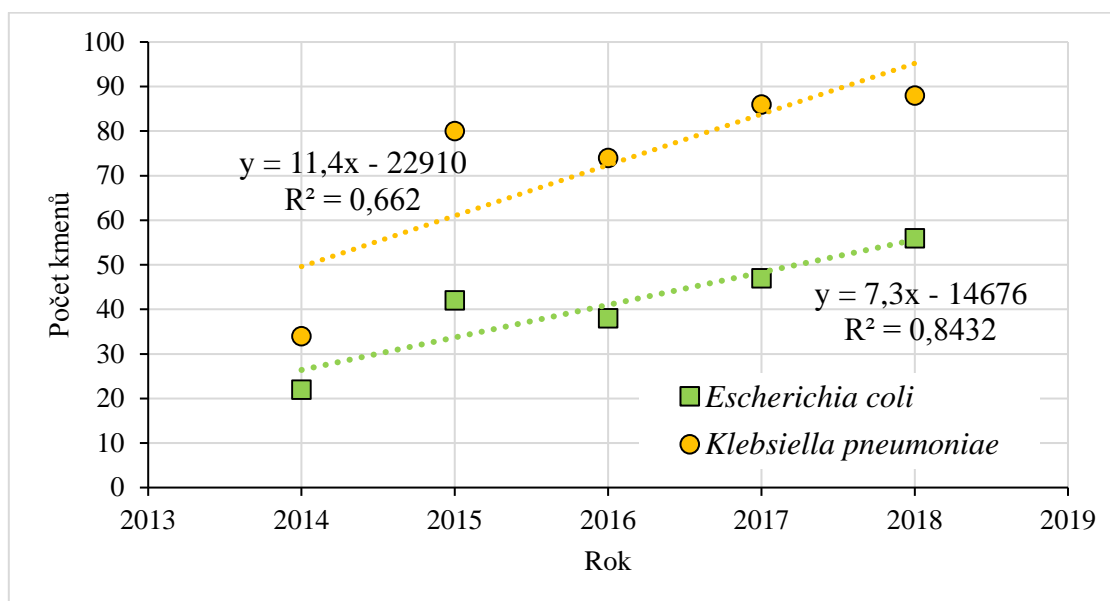
Roky	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Celkový počet	Produkce ESBL (%)	Celkový počet	Produkce ESBL (%)
2014	1758	22 (1%)	452	34 (8%)
2015	1730	42 (2%)	490	80 (16%)
2016	1592	38 (2%)	495	74 (15%)
2017	1614	47 (3%)	545	86 (16%)
2018	1575	56 (4%)	511	88 (17%)

Z tabulky 3 je patrné, že v letech 2014–2018 bylo zachyceno více kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v porovnání s kmeny *Escherichia coli* s produkcí ESBL.



Obr. 1: Celkové množství kmenů *Escherichia coli* (ESCO) a kmenů *Klebsiella pneumoniae* (KLPN) s produkcí ESBL zachycené v letech 2014–2018.

Na obrázku 2 je zachyceno statistické zpracování pomocí lineární regrese, zda celkové počty kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL ovlivňuje narůstající čas.



Obr. 2: Korelační závislost počtu kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL a roky 2014-2018.

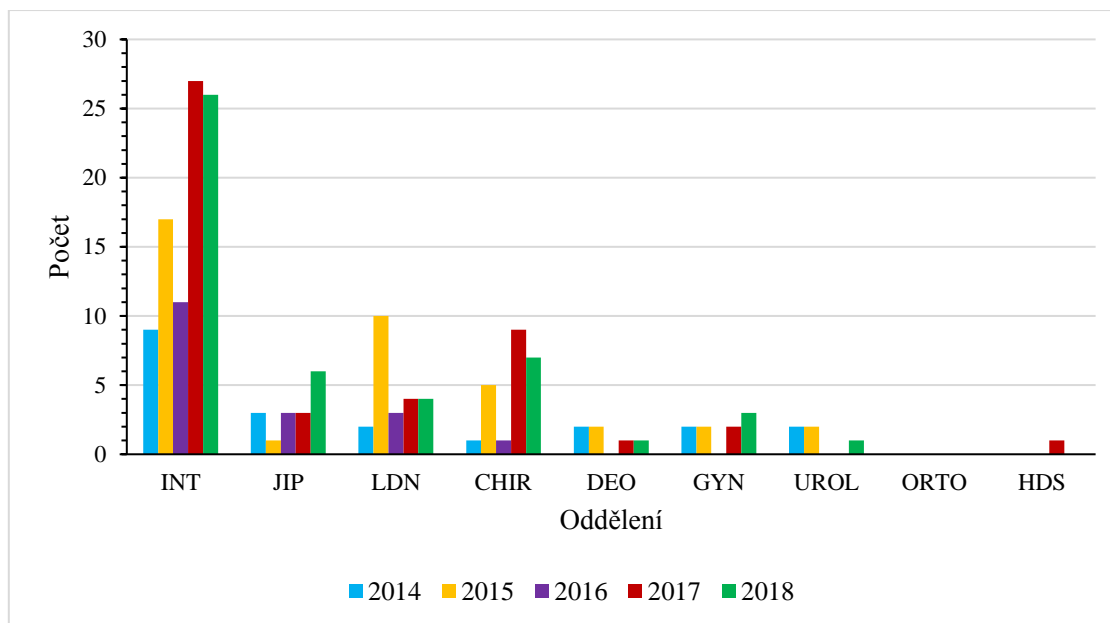
V případě kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL byl vypočítán regresní koeficient  $R^2 = 0,8432$ , ze kterého byl ještě vypočítán korelační koeficient s hodnotou 0,9183. Jelikož se hodnota korelačního koeficientu blíží 1, znamená to, že závislost je silná a přímá. Z toho vyplývá statisticky významný vliv mezi počty kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL a narůstajícím časem. V případě kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL byl vypočítán regresní koeficient  $R^2 = 0,662$ , ze kterého byl ještě vypočítán korelační koeficient s hodnotou 0,8136. Jelikož se hodnota korelačního koeficientu blíží 1, znamená to, že závislost je silná a přímá. Z toho vyplývá statisticky významný vliv mezi počty kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL a narůstajícím časem.

## 5.1 Rozdělení výskytu izolátů podle jednotlivých oddělení v nemocnici

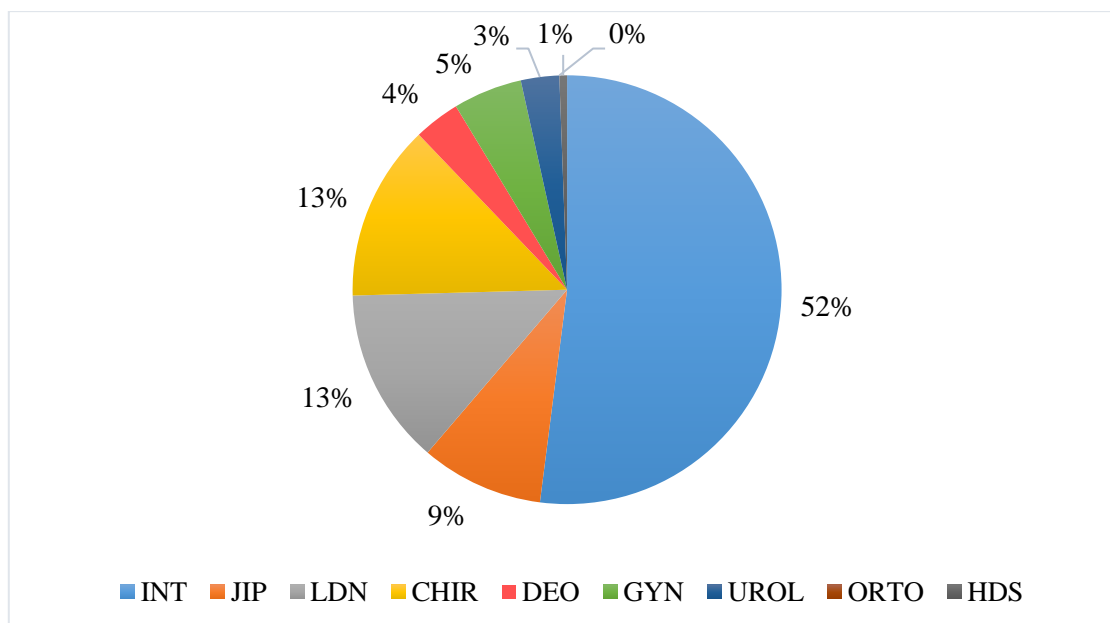
### 5.1.1 *Escherichia coli* s produkcí ESBL

Obrázek 3 zobrazuje výskyt kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL v letech 2014 až 2018 na jednotlivých odděleních, konkrétně interní oddělení (INT), jednotka intenzivní péče (JIP), léčebna dlouhodobě nemocných (LDN), chirurgické oddělení (CHIR), dětské oddělení (DEO), gynekologicko-porodnické oddělení (GYN), urologická

ambulance (UROL.), ortopedicko-traumatologické oddělení (ORTO) a hemodialýza (HDS). U každého oddělení je vždy zobrazen jeden barevně odlišný sloupec zobrazující počet záchytů pro daný rok. Pokud sloupec chybí, znamená to, že v daném roce nebyl zachycen na oddělení žádný izolát s produkcí ESBL. Obrázek 4 shrnuje celkový počet záchytů na jednotlivých odděleních za 5 let.



Obr. 3: Počet kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL na jednotlivých odděleních v letech 2014–2018.

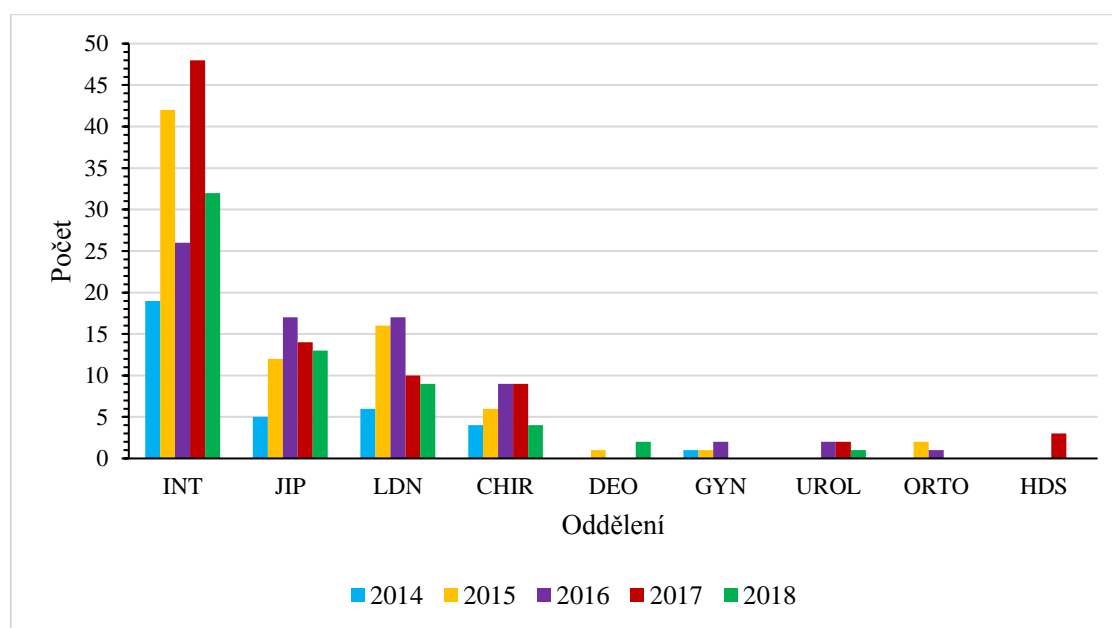


Obr. 4: Procentuální počet kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL na jednotlivých odděleních za 5 let (2014–2018).

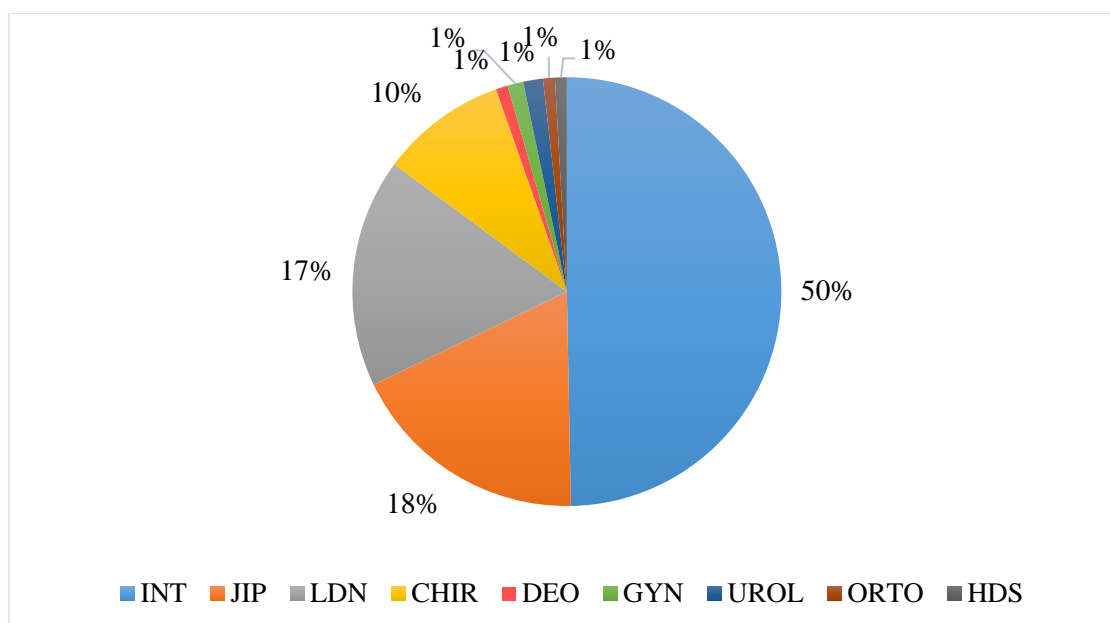


### 5.1.2 *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL

Obrázek 5 zobrazuje výskyt kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v letech 2014 až 2018 na jednotlivých odděleních, konkrétně interní oddělení (INT), jednotka intenzivní péče (JIP), léčebna dlouhodobě nemocných (LDN), chirurgické oddělení (CHIR), dětské oddělení (DEO), gynekologicko-porodnické oddělení (GYN), urologická ambulance (UROL.), ortopedicko-traumatologické oddělení (ORTO) a hemodialýza (HDS). U každého oddělení je vždy zobrazen jeden barevně odlišný sloupec zobrazující počet záchytů pro daný rok. Pokud sloupec chybí, znamená to, že v daném roce nebyl zachycen na oddělení žádný izolát s produkcí ESBL. Obrázek 6 shrnuje celkový počet záchytů na jednotlivých odděleních za 5 let.



Obr. 5: Počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL na jednotlivých odděleních v letech 2014–2018.



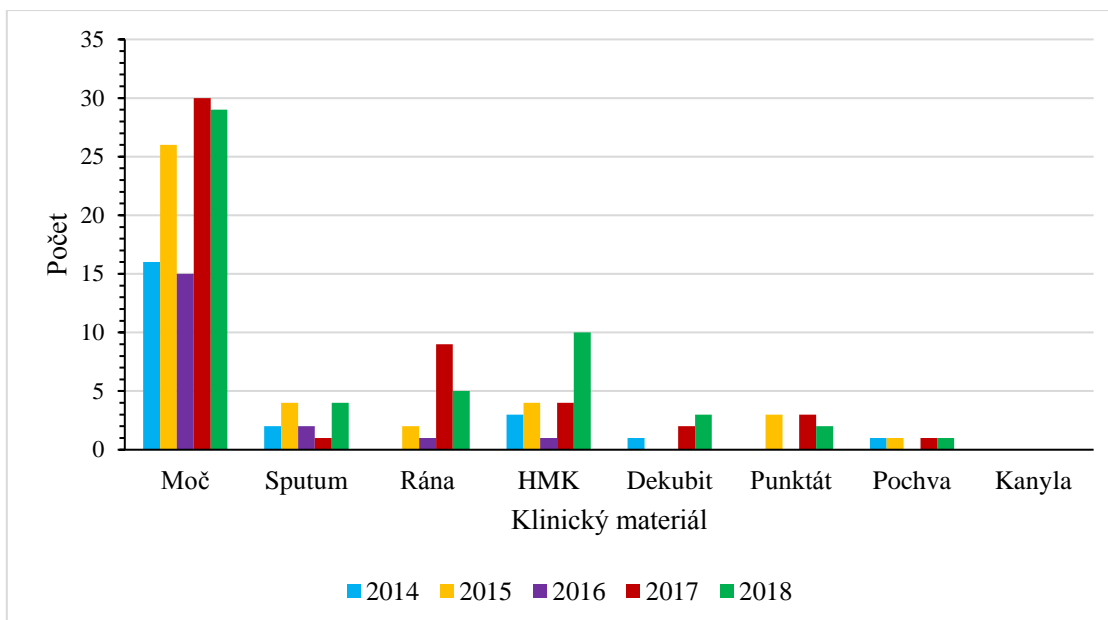
Obr. 6: Procentuální počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL na jednotlivých odděleních za 5 let (2014–2018).

Po statistickém zpracování s použitím chí kvadrátu byla zjištěna hodnota signifikance  $p = 0,0016$ , což je menší než  $0,05$ . Proto může být nulová hypotéza, že jsou proměnné nezávislé, zamítnuta. Rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami, v tomto případě mezi výsledky jednotlivých nemocničních oddělení, je statisticky významný

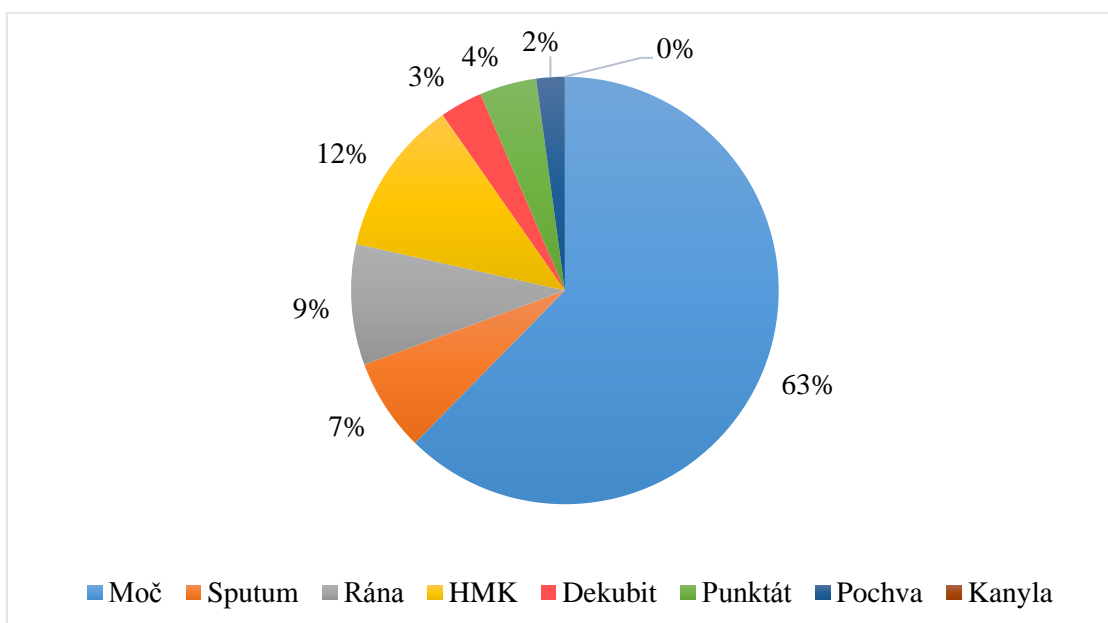
## 5.2 Rozdělení výskytu izolátů v klinickém materiálu

### 5.2.1 *Escherichia coli* s produkcí ESBL

Obrázek 7 zobrazuje výskyt kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL v letech 2014 až 2018 v jednotlivých typech klinického materiálu. Tento bakteriální kmen byl detekován v moči, sputu, ráně, hemokultuře (HMK), dekubitu, punktátu a pochvě. U každého druhu klinického materiálu je vždy zobrazen jeden barevně odlišný sloupec zobrazující počet záchytů pro daný rok. Pokud sloupec chybí, znamená to, že v daném roce nebyl zachycen z klinického materiálu žádný izolát s produkcí ESBL. Obrázek 8 shrnuje celkový počet záchytů v jednotlivých klinických materiálech za 5 let.



Obr. 7: Počet kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL v jednotlivých typech klinického materiálu v letech 2014–2018.

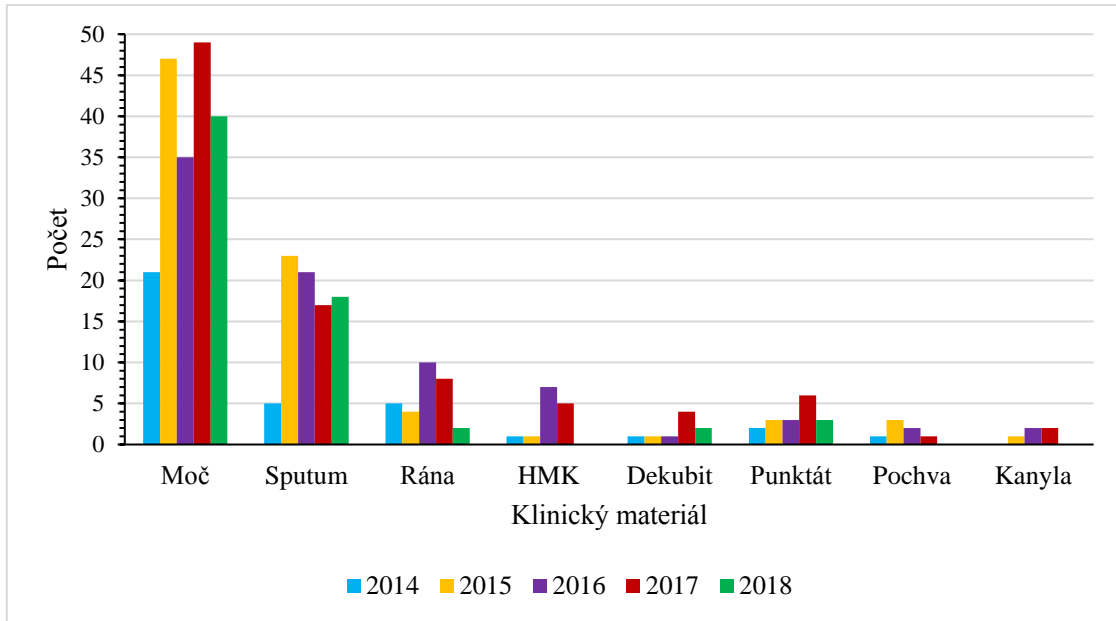


Obr. 8: Procentuální počet kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL v jednotlivých typech klinického materiálu za 5 let (2014–2018).

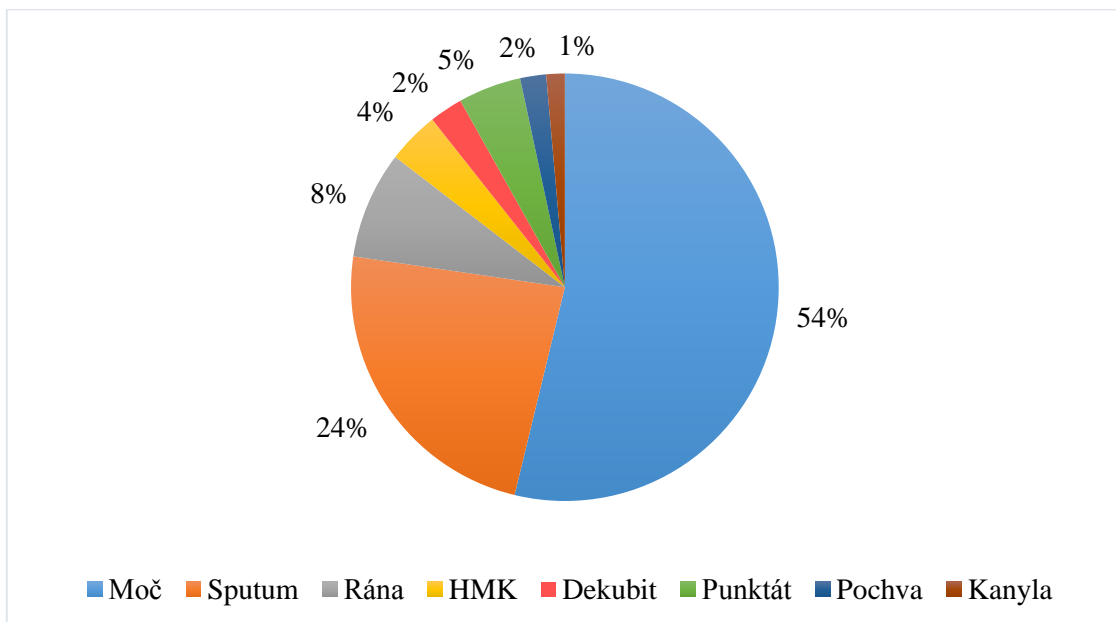
### 5.2.2 *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL

Obrázek 9 zobrazuje výskyt kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v letech 2014 až 2018 v jednotlivých typech klinického materiálu. Tento bakteriální kmen byl detekován v moči, sputu, ráně, hemokultuře (HMK), dekubitu, punktátu, pochvě a kanyle. U každého druhu klinického materiálu je vždy zobrazen jeden barevně

odlišný sloupec zobrazující počet záchytů pro daný rok. Pokud sloupec chybí, znamená to, že v daném roce nebyl zachycen z klinického materiálu žádný izolát s produkcí ESBL. Obrázek 10 shrnuje celkový počet záchytů v jednotlivých klinických materiálech za 5 let.



Obr. 9: Počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v jednotlivých typech klinického materiálu v letech 2014–2018.



Obr. 10: Procentuální počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL v jednotlivých typech klinického materiálu za 5 let (2014–2018).

Po statistickém zpracování s použitím chí kvadrátu byla zjištěna hodnota signifikance  $p = 1,54 \cdot 10^{-5}$ , což je menší než 0,05. Proto může být nulová hypotéza, že jsou proměnné nezávislé, zamítnuta. Rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami, v tomto případě mezi výsledky jednotlivých typů klinického materiálu, je statisticky významný

### 5.3 Vývoj antibiotické rezistence

Pro zhodnocení vývoje antibiotické rezistence v letech 2014–2018 jsem u obou mikrobů využila klinický materiál moč, kde byl zjištěn nejčastější výskyt producentů ESBL. Zahrnula jsem vždy všechny izoláty jak *Escherichia coli*, tak *Klebsiella pneumoniae*, které byly zachyceny v konkrétním roce.

#### 5.3.1 *Escherichia coli*

Na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Prachatice, a.s. bylo v roce 2018 u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči zhotoveno 881 citlivostí. Na přípravě a zhotovení citlivostí diskovou difuzní metodou jsem se podílela po celý rok 2018. Pro ostatní roky jsem využila data z laboratorního informačního systému OpenLIMS od firmy STAPRO s.r.o. Tabulka 4 zobrazuje celkový počet zhotovených citlivostí v letech 2014–2018 u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči.

Tab. 4: Celkový počet zhotovených citlivostí v letech 2014–2018 u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči.

<i>Escherichia coli</i>					
Roky	2014	2015	2016	2017	2018
Citlivostí celkem	875	966	940	913	881

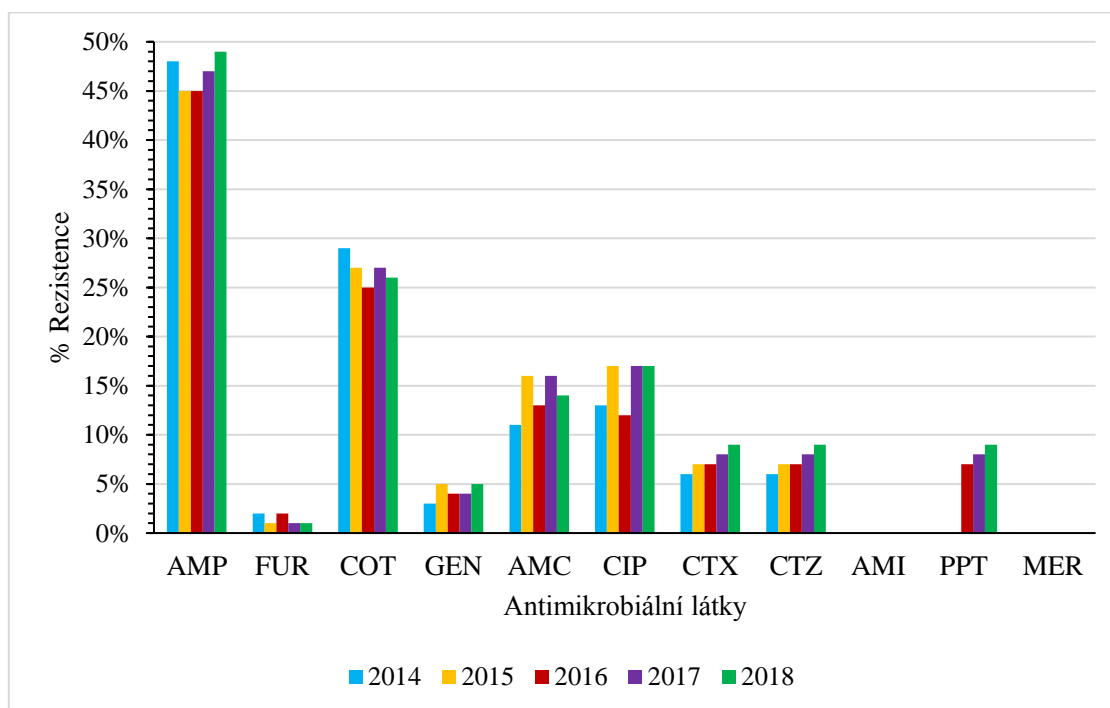
Z tabulky 4 je patrné, kolik bylo v každém roce zhotoveno celkem citlivostí u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči. Z celkového počtu zhotovených citlivostí v každém roce jsem sledovala vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* k vybraným antimikrobiálním látkám (AMP, FUR, COT, GEN, AMC, CIP, CTX, CTZ, AMI, PPT, MER) v časovém úseku 5 let, který je zobrazen v tabulce 5 a graficky je znázorněn na obrázku 11.

Tab. 5: Vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči v letech 2014–2018 k vybraným antimikrobiálním látkám.

ATB	Roky									
	2014		2015		2016		2017		2018	
	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.
AMP	414	48%	437	45%	420	45%	426	47%	427	49%
FUR	16	2%	12	1%	14	2%	12	1%	8	1%
COT	250	29%	262	27%	235	25%	249	27%	230	26%
GEN	23	3%	44	5%	39	4%	40	4%	46	5%
AMC	94	11%	152	16%	123	13%	145	16%	124	14%
CIP	106	13%	161	17%	112	12%	157	17%	153	17%
CTX	52	6%	66	7%	61	7%	73	8%	76	9%
CTZ	52	6%	66	7%	61	7%	73	8%	76	9%
AMI	0	0%	0	0%	1	0%	3	0%	0	0%
PPT	-	-	-	-	62	7%	72	8%	80	9%
MER	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%

Legenda: R. – rezistentní, % R. – procento rezistentních, AMP – ampicilin, FUR – nitrofurantoin, COT – trimetoprim + sulfonamid, GEN – gentamicin, AMC – amoxicilin + klavulanát, CIP – ciprofloxacín, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, AMI – amikacin, PPT – piperacilin + tazobaktam, MER – meropenem

Hodnoty rezistentních kmenů u PPT v roce 2014 a 2015 nejsou uvedeny, protože se v té době toto antibiotikum pro testování v laboratoři nepoužívalo.



Obrázek 11: Vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z moči v letech 2014–2018 k vybraným antimikrobiálním látkám.

### 5.3.2 *Klebsiella pneumoniae*

Na Oddělení lékařské mikrobiologie v Nemocnici Prachatice, a.s. bylo v roce 2018 u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči zhotoveno 271 citlivostí. Na přípravě a zhotovení citlivostí diskovou difuzní metodou jsem se podílela po celý rok 2018. Pro ostatní roky jsem využila data z laboratorního informačního systému OpenLIMS od firmy STAPRO s.r.o. Tabulka 6 zobrazuje celkový počet zhotovených citlivostí v letech 2014–2018 u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči.

Tab. 6: Celkový počet zhotovených citlivostí v letech 2014–2018 u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
Roky	2014	2015	2016	2017	2018
Citlivostí celkem	243	250	224	268	271

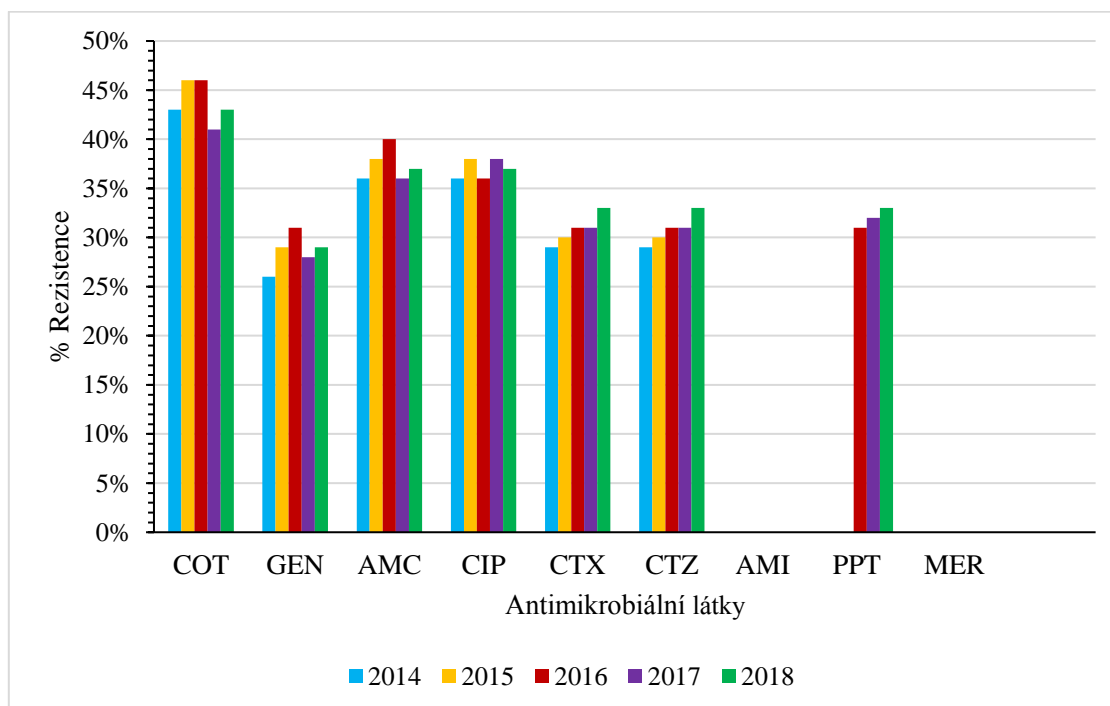
Z tabulky 6 je patrné, kolik bylo v každém roce zhotoveno celkem citlivostí u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči. Z celkového počtu zhotovených citlivostí v každém roce jsem sledovala vývoj antibiotické rezistence u *Klebsiella pneumoniae* k vybraným antimikrobiálním látkám (COT, GEN, AMC, CIP, CTX, CTZ, AMI, PPT, MER) v časovém úseku 5 let, který je zobrazen v tabulce 7 a graficky je znázorněn na obrázku 12.

Tab. 7: Vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči v letech 2014–2018 k vybraným antimikrobiálním látkám.

ATB	Roky									
	2014		2015		2016		2017		2018	
	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.	R.	% R.
COT	105	43%	115	46%	104	46%	111	41%	116	43%
GEN	63	26%	72	29%	69	31%	75	28%	79	29%
AMC	87	36%	95	38%	89	40%	97	36%	99	37%
CIP	88	36%	94	38%	81	36%	101	38%	100	37%
CTX	71	29%	74	30%	69	31%	83	31%	89	33%
CTZ	71	29%	74	30%	69	31%	83	31%	89	33%
AMI	0	0%	0	0%	0	0%	1	0%	0	0%
PPT	-	-	-	-	70	31%	85	32%	90	33%
MER	0	0%	1	0%	0	0%	0	0%	1	0%

Legenda: R. – rezistentní, % R. – procento rezistentních, COT – trimetoprim + sulfonamid, GEN – gentamicin, AMC – amoxicilin + klavulanát, CIP – ciprofloxacín, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, AMI – amikacin, PPT – piperacilin + tazobaktam, MER – meropenem

Hodnoty rezistentních kmenů u PPT v roce 2014 a 2015 nejsou uvedeny, protože se v té době toto antibiotikum pro testování v laboratoři nepoužívalo. Není uveden také ampicilin, protože druh *Klebsiella pneumoniae* je k tomuto antibiotiku přirozeně rezistentní. Také není uveden nitrofurantoin, protože pro druh *Klebsiella pneumoniae* není stanoven breakpoint v EUCASTu.



Obr. 12: Vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči v letech 2014–2018 k vybraným antimikrobiálním látkám.



## 6. Diskuse

Tato práce byla zaměřena na sledování a detekci dvou nejčastějších producentů ESBL, kterými jsou kmeny *Escherichia coli* a kmeny *Klebsiella pneumoniae*, v letech 2014–2018 v Nemocnici Prachatice a.s. V případě kmenů *Escherichia coli* došlo v tomto časovém úseku ke zvýšení počtu producentů ESBL z 1 % na 4 %. V porovnání s kmeny *Klebsiella pneumoniae*, je to nárůst mírný, jelikož počet kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL se zvýšil z 8 % na 17 %.

Po rozdělení producentů ESBL podle nemocničních oddělení byl zjištěn v obou případech mikrobů nejčastější výskyt na interním oddělení. Konkrétně u kmenů *Escherichia coli* se jednalo o 52 % izolátů produkujících ESBL a u kmenů *Klebsiella pneumoniae* se jednalo o 50 % izolátů produkujících ESBL. To může být způsobeno tím, že interní oddělení je největším oddělením v nemocnici, které disponuje největším počtem lůžek (51 lůžek). Tudíž se zde nachází a střídá velké množství pacientů často i ve vyšší věkové kategorii s velmi rozdílnými nemocemi, u kterých je velká pravděpodobnost, že se již setkali s podáváním antibiotik, a že zde byli také hospitalizováni. S velkým počtem pacientů roste i větší riziko setkání se s nozokomiálními kmeny, které mohou produkovat i ESBL a představují tak riziko infekce i pro ostatní pacienty na oddělení. Ovšem s těmito nozokomiálními kmeny se pacient může setkat i v jiných nemocničních zařízeních a při hospitalizaci, třeba právě na zmíněném interním oddělení, může tyto kmeny šířit.

Po dalším rozdělení producentů ESBL, tentokrát podle typu klinického materiálu, byl zjištěn v obou případech mikrobů nejčastější výskyt v moči. U kmenů *Escherichia coli* se jednalo o 63 % izolátů produkujících ESBL a u kmenů *Klebsiella pneumoniae* se jednalo o 54 % izolátů produkujících ESBL. Obě tyto bakterie jsou považovány za nejčastější původce uroinfekcí. Jedny z možných příčin největšího výskytu ESBL kmenů v moči, by mohly být nadměrné používání širokospektrých antibiotik a zbytečné léčení bezpříznakové bakteriurie. Další příčinou může být zavedení permanentních katetrů, kde se riziko infekce výrazně zvyšuje. Toto tvrzení se shoduje i s názorem Kohoutové (2014), která uvádí, že 15–25 % pacientů má v průběhu hospitalizace zavedený katetr a pokud katetrizace trvá více než 6 dní, je riziko infekce již velmi vysoké. Ve studii Thadena et al. (2016), která probíhala v letech 2009–2014 v 26 nemocnicích na jihovýchodě Spojených států, byl zaznamenán nejčastější výskyt kmenů *Escherichia*

*coli* s produkcí ESBL (61 %) a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL (52 %) rovněž v moči. Výsledky této studie jsou velice podobné s mými zjištěnými výsledky.

Jelikož jsem zaznamenala největší množství producentů ESBL v moči, sledovala jsem vývoj antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči.

Z testovaných antimikrobiálních látek bych chtěla vyzdvihnout meropenem, zástupce karbapenemů, který se jevil jako nejvíce účinné antibiotikum u obou mikrobusů. Představuje totiž lék volby při těžkých infekcích způsobených producenty ESBL, a tudíž rezistence způsobená tvorbou karbapenemázy k tomuto antibiotiku představuje velmi významný problém, protože rozšíření kmenů produkujících karbapenemázy značně komplikuje léčbu a výrazně zvyšuje náklady na péči. V případě kmenů *Escherichia coli* v letech 2014–2018 nebyl zaznamenán u izolátů z moči žádný rezistentní kmen k meropenemu, což bych viděla jako velmi pozitivní zjištění. U kmenů *Klebsiella pneumoniae* byl zaznamenán jeden rezistentní kmen v roce 2015 a jeden v roce 2018. Z interaktivní online databáze European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net © 2019) je zřejmé, že v České republice je produkce karbapenemázy stále velmi nízká, a to jen 1 %.

Dále bych z testovaných antibiotik chtěla zmínit cefotaxim a ceftazidim, zástupce cefalosporinů 3. generace. S cefalosporiny 3. generace je rovněž spojen výskyt ESBL kmenů. Problém spočívá v nadužívání těchto antibiotik, což vede k častějšímu vzniku rezistence a také častějšímu výskytu kmenů produkujících ESBL. Právě u těchto antibiotik byl zjištěn u obou mikrobusů téměř každým rokem zvyšující se počet rezistentních kmenů. Konkrétně u kmenů *Escherichia coli* v roce 2014 byla zjištěna rezistence na tato antibiotika 6 %, v letech 2015 a 2016 to bylo 7 %, v roce 2017 8 % a v roce 2018 to bylo již 9 %. V případě kmenů *Klebsiella pneumoniae* byla v roce 2014 zjištěna rezistence na tato antibiotika 29 %, v roce 2015 to bylo 30 %, v roce 2016 a 2017 to bylo 31 %, v roce 2018 se počet rezistentních kmenů zvýšil již na 33 %. Ve studii Bitewa et al. (2017), která probíhala od září 2015 do května 2016 v Addis Ababa University v Etiopii, bylo zaznamenáno 35,6 % rezistentních izolátů *Escherichia coli* v moči k cefalosporinům 3. generace. V případě *Klebsiella pneumoniae* bylo zaznamenáno 44,4 % rezistentních izolátů v moči rovněž k cefalosporinům 3. generace. Pro další porovnání jsem využila studii Magyara et al. (2017), která probíhala od roku 2009 do roku 2015 na oddělení urologie v Nemocnici Jahn Ferenc South-Pest v Budapešti. Zde bylo zjištěno, že rezistence kmenů *Escherichia coli* izolovaných v moči

se k cefalosporinům 3. generace pohybovala mezi 5–16 %. U kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči se rezistence rovněž k cefalosporinům 3. generace pohybovala mezi 15–59%.

## 7. Závěr

Jedním z cílů této práce bylo osvojit si mikrobiologickou techniku při zpracování klinického materiálu. Vyzkoušet si také screeningovou metodu průkazu ESBL pomocí detekčního setu D68C MASTDISC a pro stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám jsem si vyzkoušela diskovou difuzní metodu a metodu stanovení minimální inhibiční koncentrace. Pro dourčení mikroba jsem použila komerční soupravu ENTEROtest 24 N a INDOL test. Mohu tedy říci, že všechny tyto metody jsem si prakticky vyzkoušela.

Dalším cílem bylo zjistit celkový počet kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL za časový úsek 5 let. U kmenů *Escherichia coli* bylo v roce 2014 detekováno 22 izolátů s produkcí ESBL, tedy 1 % z celkového množství všech detekovaných kmenů *Escherichia coli*. V roce 2015 bylo detekováno 42 izolátů s produkcí ESBL, tedy 2 %. V roce 2016 bylo detekováno 38 izolátů s produkcí ESBL, tedy 2 %. V roce 2017 bylo detekováno 47 izolátů s produkcí ESBL, tedy 3 %. V roce 2018 jsem zaznamenala již 56 izolátů s produkcí ESBL, tedy 4 %. V případě kmenů *Klebsiella pneumoniae* bylo v roce 2014 detekováno 34 izolátů s produkcí ESBL, tedy 8 % z celkového množství všech detekovaných kmenů *Klebsiella pneumoniae*. V roce 2015 bylo detekováno již 80 izolátů s produkcí ESBL, tedy 16 %. V roce 2016 bylo detekováno 74 izolátů s produkcí ESBL, tedy 15 %. V roce 2017 bylo detekováno 86 izolátů s produkcí ESBL, tedy 16 %. V roce 2018 jsem zaznamenala již 88 izolátů s produkcí ESBL, tedy 17 %. Mohu tedy říci, že u kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL, došlo ke zvýšení počtu o 3 % za 5 let. V případě kmenů *Klebsiella pneumoniae* produkující ESBL došlo ke zvýšení počtu o 9 % za 5 let.

Dalším cílem bylo porovnat výskyt a jednotlivé zastoupení kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL podle nemocničních oddělení. V tomto případě byl jednoznačně největší výskyt u obou bakterií na interním oddělení. U kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL se jednalo o 52 % a u kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL se jednalo o 50 %.

Dalším cílem bylo porovnat výskyt a jednotlivé zastoupení kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL podle výskytu v různých typech klinického materiálu. V tomto případě byl jednoznačně největší výskyt u obou bakterií prokázán v moči. U kmenů *Escherichia coli* s produkcí ESBL se jednalo o 63 % a u kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL se jednalo o 54 %.

Posledním cílem bylo zhodnotit vývoj antibiotické rezistence v časovém úseku 5 let u kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* izolovaných z moči, kde byl zachycen právě největší počet producentů ESBL.

V případě izolátů *Escherichia coli* bylo zjištěno nejvíce rezistentních kmenů na ampicilin, a to až 49 %. Druhou nejvyšší rezistenci vykazovaly kmeny na trimetoprim + sulfonamid až 29 %. U ciprofloxacinu byla zjištěna rezistence až 17 %. U zástupce inhibitorů beta-laktamáz amoxicilin + kyselina klavulanová byla zjištěna rezistence až 16 %. U druhého zástupce inhibitorů beta-laktamáz piperacilin + tazobaktam byla zjištěna vzrůstající rezistence každým rokem (2016–2018) ze 7 % na 9 %. U cefalosporinů 3. generace (cefotaxim, ceftazidim) během pěti let došlo ke zvýšení rezistence z 6 % na 9 %. Velmi dobrá citlivost byla zjištěna u skupiny aminoglykosidů - gentamicin, amikacin. U gentamicinu se počet rezistentních kmenů pohyboval mezi 3–5 %, u amikacinu byl zaznamenán pouze jeden rezistentní kmen v roce 2016 a pouze 3 rezistentní kmeny v roce 2017. Největší účinnost byla zjištěna u nitrofurantoinu, kde se rezistence pohybovala jen mezi 1–2 %. Dále jako neúčinnější antibiotikum se jeví meropenem, zástupce karbapenemů, u kterého za časový úsek 5 let nebyl zachycen žádný rezistentní kmen.

V případě izolátů *Klebsiella pneumoniae* bylo zjištěno nejvíce rezistentních kmenů na trimetoprim + sulfonamid, a to až 46 %. U inhibitorů beta-laktamáz amoxicilin + kyselina klavulanová byla zjištěna rezistence až 40 % a u piperacilin + tazobaktam se počet rezistentních kmenů zvyšoval každým rokem (2016–2018) z 31 % na 33 %. Na ciprofloxacin bylo rezistentních kmenů až 38 %. U cefalosporinů 3. generace (cefotaxim, ceftazidim) během pěti let došlo ke zvýšení rezistence z 29 % na 33 %. Rezistence na gentamicin dosahovala maximálně 31 %. Největší účinnost byla zjištěna na amikacin, kdy byl detekován pouze jeden rezistentní kmen v roce 2017. Dále také největší účinnost byla zjištěna na meropenem, kdy byl detekován jeden rezistentní kmen v roce 2015 a jeden rezistentní kmen v roce 2018.

V letech 2014–2018 nebyl zaznamenán u jednotlivých antimikrobiálních látek žádný zásadní kontinuální nárůst rezistentních kmenů. Pouze v případě piperacilin + tazobaktamu, kde se u obou mikrobu každým rokem (2016–2018) zvyšovala rezistence. U kmenů *Escherichia coli* došlo ke zvýšení rezistence o 2 % a u kmenů *Klebsiella pneumoniae* o 2 %.

Také v případě cefalosporinů 3. generace u obou mikrobů se rezistence téměř s každým rokem zvyšovala. U kmenů *Escherichia coli* došlo ke zvýšení rezistence o 3 % za 5 let. U kmenů *Klebsiella pneumoniae* došlo ke zvýšení rezistence o 4 % za 5 let.

Z výše uvedených zjištění mohu hypotézu č. 1 (Předpokládám, že s narůstajícím časem stoupá i počet kmenů *Escherichia coli* a kmenů *Klebsiella pneumoniae* s produkcí ESBL) potvrdit pouze z části, jelikož u obou mikrobů byl v roce 2016 zjištěn menší počet izolátů než v předchozím roce. Hypotéza č. 2 (Předpokládám, že nejčastějším producentem ESBL bude *Klebsiella pneumoniae*) byla zcela potvrzena. Hypotéza č. 3 (Předpokládám, že největší počet producentů ESBL bude v klinickém materiálu sputum) mému pozorování neodpovídá, tudíž nebyla potvrzena. Hypotéza č. 4 (Předpokládám, že největší počet producentů ESBL bude na interním oddělení) mému pozorování odpovídá zcela, tudíž tato hypotéza byla potvrzena.

## 8. Seznam literatury

1. ABDOLLAHI, A., SHOKOHI, T., NABILI, M., 2014. Development in blood culture system to detect fungemia from past until now. *Journal of clinical excellence*. 3(1), 87-107. ISSN 1475-9896.
2. AMBLER, R. P., 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 289 (1036), 321-331, doi:10.1098/rstb.1980.0049.
3. ANANTHAN, S., SUBHA, A., 2005. Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol*. 23(1), 20-23, doi:10.4103/0255-0857.13867.
4. BAUER, M. P., NOTERMANS, D. W., VAN BENTHEM, B. H., BRAZIER, J. S., WILCOX, M. H., RUPNIK, M., MONNET, D. L., VAN DISSEL, J. T., KUIJPER, E. J., 2011. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet*. 377(9759), 63-73, doi:10.1016/S0140-6736(10)61266-4.
5. BENEŠ, J., 2011. Ertapenem a jeho postavení mezi ostatními karbapenemy. *Klin Farmakol Farm* [online]. 25(3), 144-149 [cit. 2018-12-26]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2011/03/10.pdf>
6. BENEŠ, J., 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada. 600 s. ISBN 978-80-271-0636-3.
7. BENNETT, P. M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 153(1), 347-357, doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
8. BITEW, A., MOLALIGN, T., CHANIE, M., 2017. Species distribution and antibiotic susceptibility profile of bacterial uropathogens among patients complaining urinary tract infections. *BMC infectious diseases*, 17(1), 654. doi:10.1186/s12879-017-2743-8.
9. BRADFORD, P. A., 2001. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev*. 14(4), 933–951, doi:10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.
10. BRYAN, CH., 2015. Urinary tract infections. In: *Microbiologybook.org* [online]. University of South Carolina School of Medicine [cit. 2018-08-04]. Dostupné z: <http://www.microbiologybook.org/Infectious%20Disease/Urinary%20Tract%20Infections.htm>

11. BUSH, K., JACOBY, G. A., MEDEIROS, A. A., 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6), 1211-1233. ISSN 1098-6596.
12. CAREY, R. B., SCHUSTER, M. G., MCGOWAN, K. L., 2011. *Lékařská mikrobiologie v klinických případech*. Praha: Triton. 328 s. ISBN 978-80-7387-480-3.
13. COHEN, T., 1998. Bactec 9050 System Users Manual. *Scribd* [online]. Sparks, Maryland USA [cit. 2018-08-06]. Dostupné z: <https://www.scribd.com/document/212304084/Bactec-9050-User-Manual>
14. DRAWZ, S. M., BONOMO, R. A., 2010. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews.* 23(1), 160-201, doi:10.1128/CMR.00037-09.
15. *ENTEROtest 24 N*, 2018. [online]. Erba Lachema. Brno [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: [https://www.erbalachema.com/attachments/ENTEROtest%2024%20N\\_CZ\\_SK\\_EN\\_RU\\_PL\\_G.pdf](https://www.erbalachema.com/attachments/ENTEROtest%2024%20N_CZ_SK_EN_RU_PL_G.pdf)
16. EUCAST, 2019. *Disková difuzní metoda pro vyšetření citlivosti k antibiotikům* [online]. Ver. 7.0 (leden 2019). Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova\\_metoda/EUCAST\\_Diskova\\_difuze\\_Manual\\_v\\_7.0.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Diskova_difuze_Manual_v_7.0.pdf)
17. *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network: Data from the ECDC Surveillance Atlas – Antimicrobial resistance*, © 2019. [online]. European Centre for Disease Prevention and Control. [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
18. GRENINGER, A. L., CHATTERJEE, S. S., CHAN, L. C., HAMILTON, S. M., CHAMBERS, H. F., CHIU, CH, Y., TANG, P., 2016. Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Fifth-Generation Cephalosporins Reveals Potential Non-mecA Mechanisms of Resistance. *PLOS ONE*, 11(2), doi:10.1371/journal.pone.0149541.
19. HARDIANTO, D., ROYANI, J., SAFARRIDA, A., 2016. Cephalosporin C Acylase from Microbes for One-step Enzymatic Transformation of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 10(4), 2495-2499, doi:10.22207/JPAM.10.4.03. ISSN 09737510.



20. HRABÁK, J., 2007. Klinicky významné  $\beta$ -laktamázy gramnegativních bakterií: širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL). *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 56 (3), 103-111. ISSN 1210-7913.
21. HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, M., VOJTOVÁ, V., HANULÍK, V., SUCHÁNKOVÁ, H., KOLÁŘ, M., 2012. Rezistence enterobakterií k vybraným antibiotikům v souvislosti s jejich spotřebou. *Klin Farmakol Farm* [online]. 26(2), 61-66 [cit. 2018-12-02]. ISSN 1803-5353. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/02/02.pdf>
22. JACOBY, G. A., MUNOZ-PRICE, L. S., 2005. The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine.* 352(4), 380–391, doi:10.1056/nejmra041359. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra041359>.
23. KOHOUTOVÁ, J. 2014. Uroinfekce spojené se zdravotní péčí – epidemiologie, prevence. *Urologie pro praxi.* 15(1), 30-31. ISSN 1803-5299.
24. KOLÁŘ, M., 2007. Klinický význam širokospektrých  $\beta$ -laktamáz a zkušenosti s jejich identifikací v mikrobiologické praxi. *Klin Mikrobiol Inf Léč.* 13(5), 195-205. ISSN 1211-264X.
25. KUMAR, A., SCHWEIZER, H., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 57(10), 1486-1513, doi:10.1016/j.addr.2005.04.004.
26. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie.* 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. 672 s. ISBN 978–80–7262–373–0.
27. MAGYAR, A., KÖVES, B., NAGY, K., DOBÁK, A., ARTHANAREESWARAN, V. K. A., BÁLINT, P., WAGENLEHNER, F., TENKE, P., 2017. Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens between 2004 and 2015 in a tertiary care hospital in Hungary. *Journal of Medical Microbiology,* 66(6), 788-797, doi:10.1099/jmm.0.000498.
28. *MASTDISCS® Combi AmpC and ESBL detection discs*, 2018. [online]. MAST GROUP. [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://mast-group.com/de/products/microbiology/esbl-ampc-and-carbapenemase-detection-kits/171682/>
29. *MIC GN 2*, 2018. [online]. DIAGNOSTICS s.r.o. Galanta, Slovenská republika [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <http://www.diagnostics.sk/produkty/mic-soupravy/preview-file/7002-mic-gn-2-na-vod-cz-1-03-1846.pdf>

30. MUNITA, J., M., CESAR, A. A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*. 4(2), 481-511, doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
31. NOURRISSON, C., TAN, R. N., HENNEQUIN, C., GIBOLD, L., BONNET, R., ROBIN, F., 2015. The MAST® D68C test: an interesting tool for detecting extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34(5), 975-83, doi: 10.1007/s10096-014-2305-6.
32. NYČ, O., 2017. Novinky a trendy v antibiotické léčbě. *Interní Med.* 19 (3), 142-144. ISSN 1803-5256.
33. PAPADAKIS, M. A., McPHEE, S. J., RABOW, M. W., 2018. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 57 issue. USA: McGraw-Hill Education. 1952 p. ISBN 978-1-25-986148-2.
34. PARTRIDGE, S. R., 2015. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology*. 47(3), 276-284, doi:10.1097/PAT.000000000000237.
35. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth informational supplement, 2006*. [online]. Clinical Laboratory Standards Institute, USA, 26(3) [cit. 2018-11-27]. Dostupné z: <http://demo.nextlab.ir/getattachment/6ee4e043-9f46-4e38-933b-7e21b4d04ac2/CLSI-M100-S16.aspx>
36. PRESTINACI, F., PEZZOTTI, P., PANTOSTI, A., 2015. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *J. Pathog. Glob. Health*. 09(7), 309–318, doi:10.1179/2047773215Y.00000000030.
37. RAWAT, D., NAIR, D., 2010. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram negative bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2(3), 263–274, doi:10.4103/0974-777X.68531. ISSN 0974-777X.
38. RONALD, N., JONES, M., D., 1992. Recent trends in the college of American pathologists proficiency results for antimicrobial susceptibility testing: Preparing for CLIA '88. *J. Clin. Microbiol. Newsl.* 14(5), 33-37, doi:10.1016/0196-4399(92)90033-6.
39. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Karolinum. 572 s. ISBN 9788024629322.
40. SEDLÁČEK, I., 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. 270 s. ISBN 8021042079.

41. SCHINDLER, J., 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., doplněné a přepracované vydání. Praha: Grada. 215 s. ISBN 9788024747712.
42. SCHWABER, M. J., NAVON-VENEZIA, S., SCHWARTZ, D., CARMELI, Y., 2005. High Levels of Antimicrobial Coresistance among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chem.* 49(5), 2137-2139, doi:10.1128/AAC.49.5.2137-2139.2005.
43. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*, 2018. [online]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. [cit. 2019-02-10]. Dostupné z: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>
44. ŠVIHOVEC, J. et al. 2018. *Farmakologie*. Praha: Grada. 1008 s. ISBN 978-80-247-5558-8.
45. THADEN, J. T., FOWLER, V. G., SEXTON, D. J., ANDERSON, D. J., 2016. Increasing Incidence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Community Hospitals throughout the Southeastern United States. *Infection control and hospital epidemiology*, 37(1), 49–54. doi:10.1017/ice.2015.239.
46. URBÁŠKOVÁ, P., 1998. *Rezistence bakterií k antibiotikům, Vybrané metody*. Praha: Trios. 90 s. ISBN 80-238-3106-2.
47. URBÁŠKOVÁ, P., HRABÁK, J., ŽEMLIČKOVÁ, H., 2012. Antibiotická rezistence bakterií – hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. In: *MEDICAL TRIBUNE* [online]. Praha [cit. 2018-11-25]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>
48. VAN DUIN, D., PATERSON, D., 2016. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. *Infect Dis Clin North Am.* 30(2), 377-390, doi: 10.1016/j.idc.2016.02.004.
49. VASHIST, H., SHARMA, D., GUPTA, A., 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Sciences.* 1(1), 1-7. ISSN 2321-550X.
50. VOTAVA, M. et al. 2000. *Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno: Masarykova univerzita. 309 s. ISBN 8021022728.
51. VOTAVA, M., 2001. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun. 231 s. ISBN 80-902896-2-2.

52. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
53. VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přepracované vydání. Brno: Neptun. 352 s. ISBN 80-86850-00-5.
54. VYTEJČKOVÁ, R., 2013. *Ošetrovatelské postupy v péči o nemocné II: speciální část*. Praha: Grada. 288 s. ISBN 978-80-247-3420-0.
55. WOODS, G., L., 1995. In vitro testing of antimicrobial agents. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 9(3), 463-81. ISSN 1557-9824.
56. ŽEMLIČKOVÁ, H., SKÁLOVÁ, A., JAKUBŮ, V., CHUDĚJOVÁ, K., ROTOVÁ, V., ŠPANĚLOVÁ, P., PAPAGIANNITSIS, C. C., HRABÁK, J., 2016. *Výskyt Enterobacteriaceae produkujících karbapenemázy (CPE, Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae) v České republice v letech 2014–2015* [online] 25(6-7), 235-238 [cit. 2018-11-18]. Dostupné z:  
[http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/25\\_2016/06\\_07\\_cerven\\_cervenec/235\\_enterobac.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/25_2016/06_07_cerven_cervenec/235_enterobac.pdf)

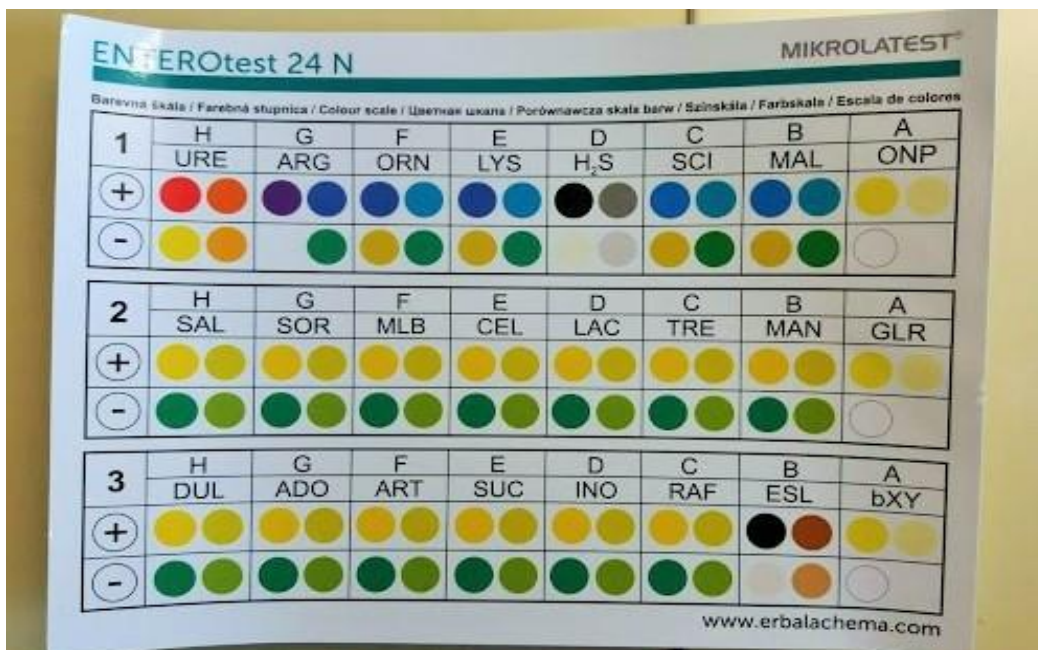
## 9. Seznam příloh

Příloha č. 1: Komerční souprava ENTEROtest 24 N – detekovaný kmen *Escherichia coli* (ESCO) a kmen *Klebsiella pneumoniae* (KLPN).



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 2: Barevná šablona dodávaná u komerční soupravy ENTEROtest 24 N, podle které se hodnotí barevné změny v jednotlivých jamkách.



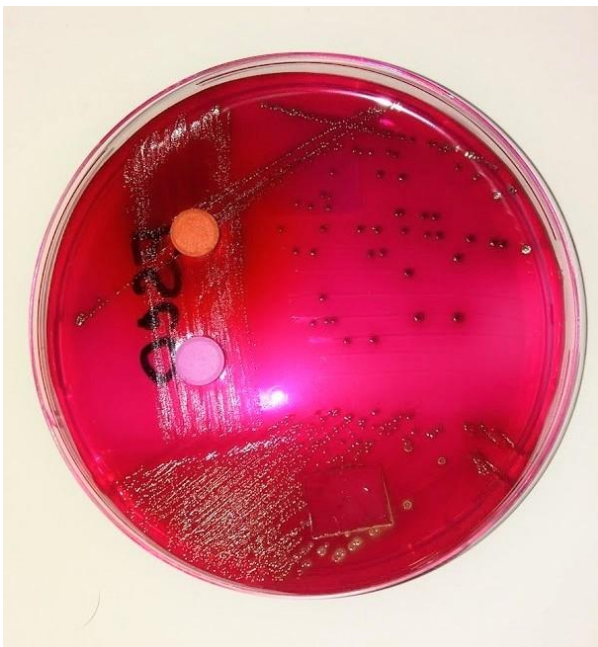
(Příbalový leták ENTEROtest 24 N, 2018)

Příloha č. 3: Indol test – produkce indolu se projeví tvorbou růžového prstence.



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 4: Kmen *Escherichia coli* identifikován na biochemickém izolačním klínu.



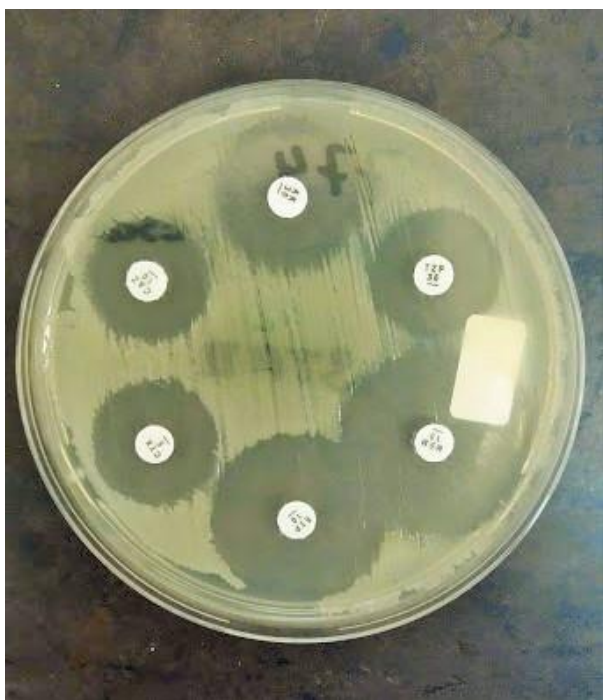
(Vlastní zdroj)

Příloha č. 5: Kmen *Klebsiella pneumoniae* identifikován na biochemickém izolačním klínu.



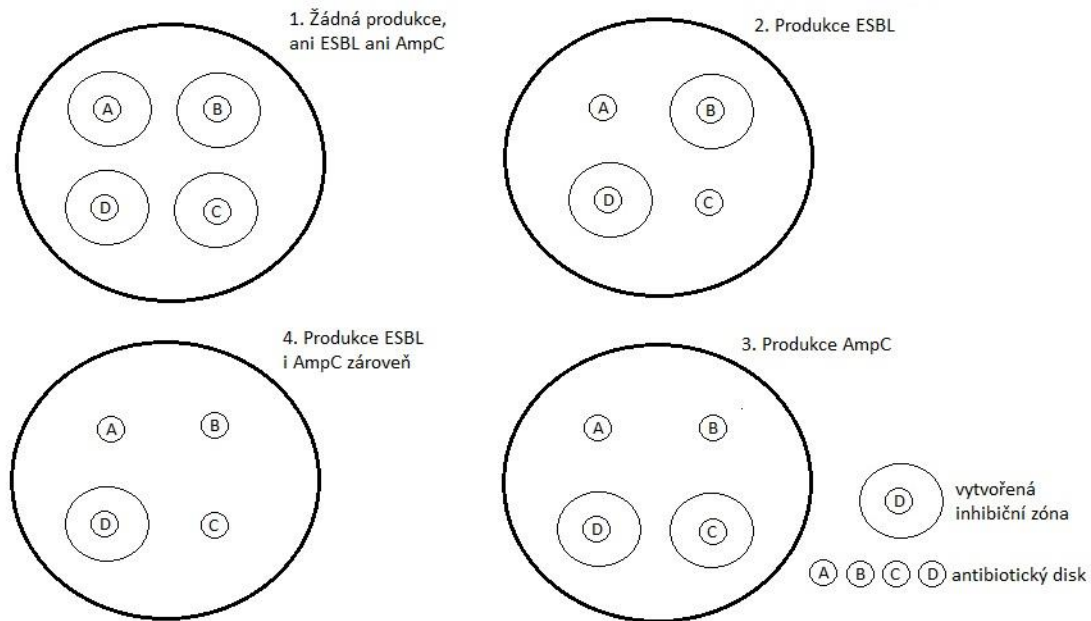
(Vlastní zdroj)

Příloha č. 6: Zhotovená citlivost na MHA agaru k vybraným antimikrobiálním látkám diskovou difuzní metodou.



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 7: MASTDISC AmpC a ESBL detekční set (D68C) – schéma všech variant, které mohou nastat.



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 8: MASTDISC AmpC a ESBL detekční set (D68C) – produkce ESBL.



(Vlastní zdroj)

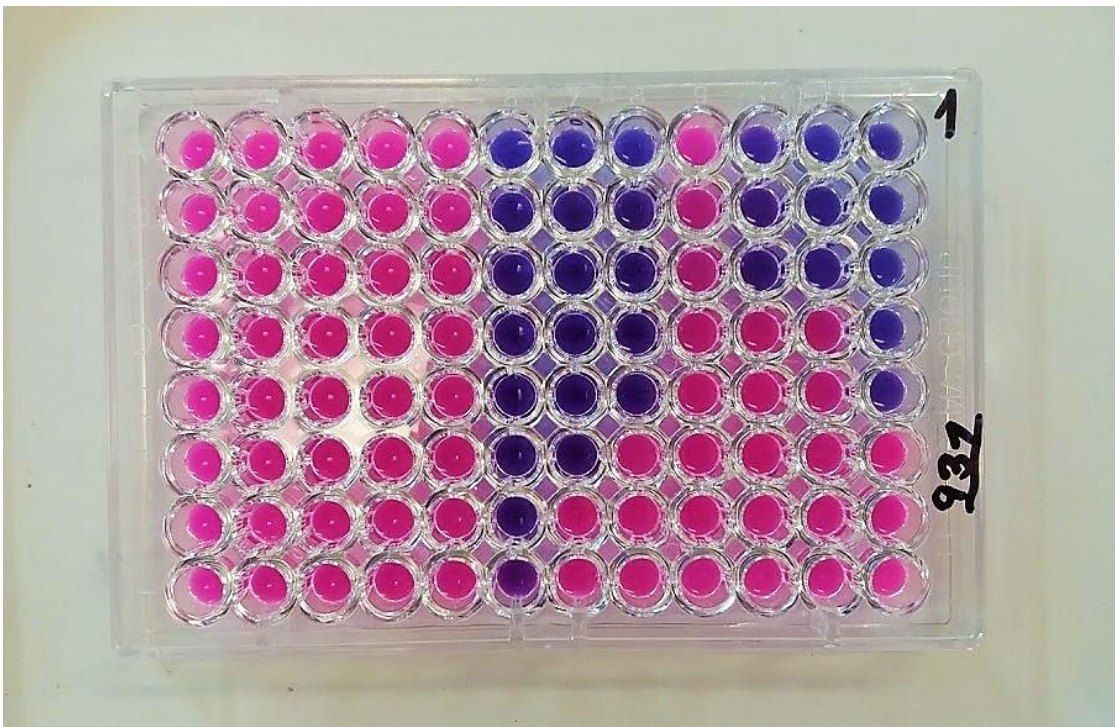


Příloha č. 9: MASTDISC AmpC a ESBL detekční set (D68C) – žádná produkce ESBL ani AmpC.



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 10: Stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí bujonové mikrodiluční metody od firmy DIAGNOSTICS s.r.o., konkrétně pro *Enterobacteriaceae* MIC GN 2.



(Vlastní zdroj)

Příloha č. 11: Šablona, podle které se odečítají minimální inhibiční koncentrace vybraných antibiotik, konkrétně u *Enterobacteriaceae* MIC GN 2 od firmy DIAGNOSTICS s.r.o.

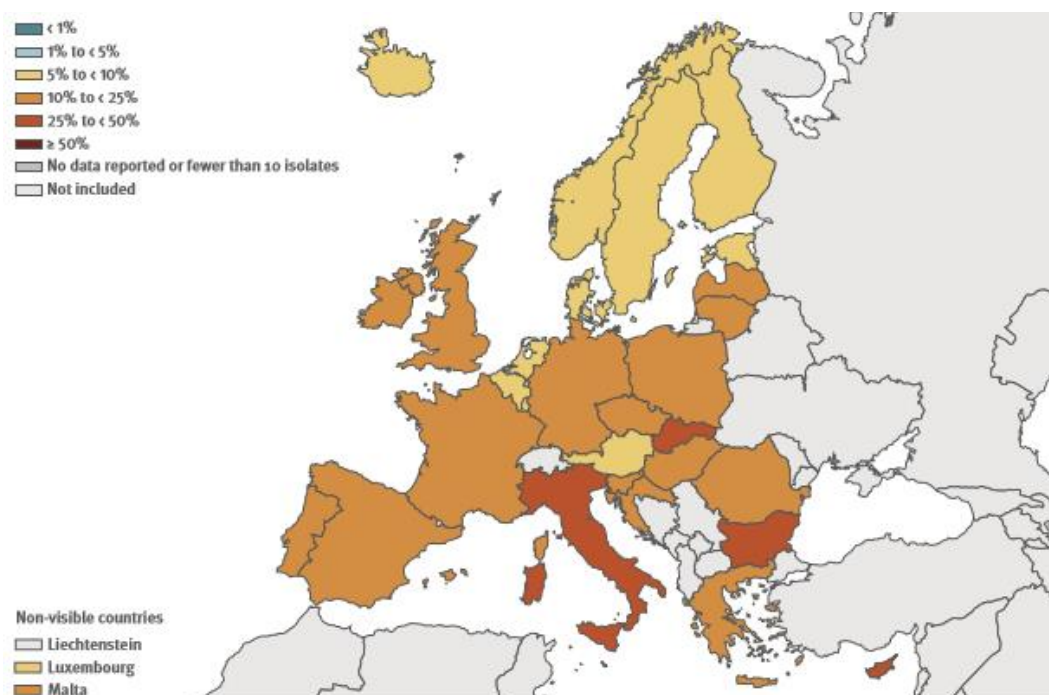
Rozložení ATB a číselné vyjádření hodnot MIC (v mg/l) pre *Enterobacteriaceae*

Název ATB	Piperacilin	Piperacilin/tazobactam	Cefotaxim	Ceftazidim	Cefoperazom	Cefoperazon sulbactam	Cefepim	Meropenem	Ertapenem	Tigecyklin	Netilmicin	Tobramycin
C(mg/l)	PIP	PIT	CTX	CAZ	CPZ	CPS	CEP	MER	ERT	TGC	NET	TOB
A	128 R	128/4 R	8 R	16 R	64	64/32	16 R	16 R	2 R	8 R	16 R	8 R
B	64 R	64/4 R	4 R	8 R	32	32/16	8 R	8 I	1 I	4 R	8 R	4 I
C	32 R	32/4 R	2 I	4 I	16	16/8	4 I	4 I	0,5 S	2 I	4 I	2 S
D	16 I	16/4 I	1	2 I	8	8/4	2 I	2 S	0,25 S	1 R	2 S	1 S
E	8 S	8/4 S	0,5	1 S	4	4/2	1 S	1 S	0,125 S	0,5 R	1 S	0,5 S
F	4 S	4/4 S	0,25	0,5 S	2	2/1	0,5 S	0,5 S	0,064 S	0,25 R	0,5 S	0,25 S
G	2 S	2/4 S	0,125	0,25 S	1	1/0,5	0,25 S	0,25 S	0,032 S	0,125 R	0,25 S	0,125 S
H	1 S	1/4 S	0,064	0,125 S	0,5	0,5/0,25	0,125 S	0,125 S	0,016 S	0,064 R	0,13 S	K

Vysvětlivky : R = rezistentní / I = intermediární / S = citlivý / K = kontrola růstu  
 Interpretace výsledků podle EUCAST – Expert Rules in Antibacterial Susceptibility Testing ([www.eucast.org](http://www.eucast.org))  
 Při hodnocení výsledku testu je potřebné zohlednit přirozené rezistence podle výsledku rodové / druhové identifikace mikroorganismu. Přirozené rezistence mikroorganismů k ATB je možné vyhledat na internetové adrese [www.diagnostics.sk/atb](http://www.diagnostics.sk/atb).

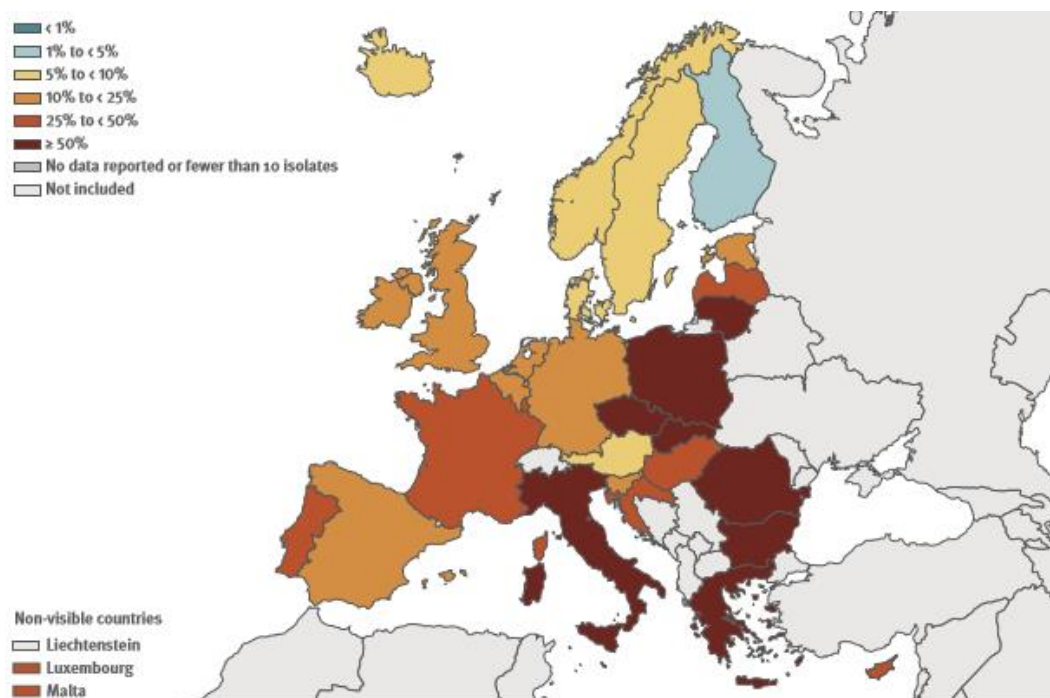
(Příbalový leták MIC GN 2, 2018)

Příloha č. 12: Rezistence na cefalosporiny 3. generace u kmenů *Escherichia coli* v Evropě v roce 2017.



(European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, © 2019)

Příloha č. 13: Rezistence na cefalosporiny 3. generace u kmenů *Klebsiella pneumoniae* v Evropě v roce 2017.



(European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, © 2019)

## 10. Seznam zkratek

ADO – adonitol

AMC – amoxicilin + klavulanát

AMI – amikacin

AMP – ampicilin

AmpC – chromozomální beta-laktamázy (třída C dle Amblera)

ARG – arginin

ART – arabitól

bXY – beta-xylosidasa

CCM – Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)

CEL – celobióza

CFU – colony-forming unit (jednotka tvořící kolonie)

CIP – ciprofloxacín

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý

COT – trimetoprim + sulfonamid

CTX – cefotaxim

CTX-M – AmpA beta-laktamázy (třída A dle Amblera)

CTZ – ceftazidim

DAEC – difuzně adherentní kmeny *Escherichia coli*

DEO – dětské oddělení

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DUL – dulcitol

EAggEC – enteroagregativní kmeny *Escherichia coli*

EARS-Net – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

EIEC – enteroinvazivní kmeny *Escherichia coli*

EPEC – enteropatogenní kmeny *Escherichia coli*

ESBL – extended epectrum beta-lactamases (širokospektré beta-laktamázy)

ESCO – *Escherichia coli*

ESL – esculin

ETEC – enterotoxigenní kmeny *Escherichia coli*

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FUR – nitrofurantoin

GEN – gentamicin

GLR – beta-glukuronidáza  
GYN – gynekologicko-porodnické oddělení  
H<sub>2</sub>S – sirovodík  
HDS – hemodialýza  
HMK – hemokultura  
CHIR – chirurgické oddělení  
IL-6 – Interleukin 6  
IMI – AmpB beta-laktamázy (třída B dle Amblera)  
INO – inositol  
INT – interní oddělení  
IZ – inhibiční zóna  
JIP – jednotka intenzivní péče  
KLPN – *Klebsiella pneumoniae*  
LAC – laktóza  
LDN – léčebna dlouhodobě nemocných  
LYS – lysin  
MAL – malonát  
MAN – mannitol  
MDR – multidrug resistance (multirezistence)  
MER – meropenem  
MHA – Mueller Hinton agar  
MIC – minimální inhibiční koncentrace  
MLB – melibióza  
MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*  
NGO – *Neisseria gonorrhoeae* agar  
ONP – beta-galaktosidáza  
ORN – ornithin  
ORTO – ortopedicko-traumatologické oddělení  
OXA – AmpD beta-laktamázy (třída D dle Amblera)  
PPT – piperacilin + tazobaktam  
RAF – raffinóza  
RNA – ribonukleová kyselina  
SAL – salicin  
SCI – Simmons citrát

SHV – AmpA beta-laktamázy (třída A dle Amblera)

SOR – sorbitol

STEC – shigatoxigenní kmeny *Escherichia coli*

SUC – sacharóza

TEM – AmpA beta-laktamázy (třída A dle Amblera)

TNF – tumor necrosis factor

TRE – trehalóza

UPEC – uropatogenní kmeny *Escherichia coli*

URE – ureáza

UROL – urologická ambulance

VIM – AmpB beta-laktamázy (třída B dle Amblera)